

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. Januar 2001 (18.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/04280 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 31/7088,
39/21

(74) Anwalt: BOECKH, Tobias; Hertin, Kurfürstendamm
54/55, 10707 Berlin (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/02262

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. Juli 2000 (08.07.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
1258/1999 8. Juli 1999 (08.07.1999) CH

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): MOLOGEN FORSCHUNGS-, ENTWICK-
LUNGS- UND VERTRIEBS GMBH [DE/DE]; Fabeck-
strasse 30, D-14195 Berlin (DE). UNIVERSITÄT
ZÜRICH [CH/CH]; Rämistrasse 71, CH-8001 Zürich
(CH).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LEUTENEGGER,
Christian [CH/CH]; Höchstrasse 1, Ch-8610 Uster
(CH). SCHROFF, Matthias [DE/DE]; Friedbergstrasse
5, D-14057 Berlin (DE). WITTIG, Burghardt [DE/DE];
Offenbacher Strasse 5, D-14197 Berlin (DE). LUTZ,
Hans [CH/CH]; Im Oberdorf, Ch-8455 Rüdlingen (CH).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 5. Juli 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: VACCINE AGAINST LENTIVIRAL INFECTIONS, SUCH AS THE FELINE IMMUNE DEFICIENCY VIRUS OF
THE CAT

(54) Bezeichnung: IMPFSTOFF GEGEN INFEKTIONEN MIT LENTIVIREN, WIE DEM FELINEN IMMUNSCHWÄCHE-VI-
RUS DER KATZE

(57) Abstract: The invention relates to a vaccine which is capable of inducing protection against disease as a result of a lentiviral infection, in particular, infection with the feline immune deficiency virus (FIV). The vaccination can be carried out in such a way, that inoculated animals can be differentiated from diseased or infected animals by the status of their antibodies. A vaccine of this type contains a DNA sequence which contains the envelope glycoprotein and preferably a part of the gene that codes for the transmembrane protein. The invention is also characterised in that suitable adjuvants are added to the vaccine mixture which elicit a cytotoxic immune response, for example cytokine of the TH1 response, cytokine coding DNA expression constructions, or immune-stimulatory DNA sequences.

(57) Zusammenfassung: Es wird ein Impfstoff beschrieben, welcher einen Schutz gegen Erkrankung infolge einer Lentivirusinfektion, insbesondere eine Infektion mit dem feline Immunschwäche-Virus (FIV), zu induzieren vermag und durch den die Impfung so gestaltet werden kann, dass geimpfte Tiere durch ihren Antikörperstatus von erkrankten oder infizierten Tieren unterschieden werden können. Ein solcher Impfstoff enthält eine DNA-Sequenz, welche das Hüllglykoprotein sowie vorzugsweise einen Teil jenes Gens enthält, welches für das Transmembranprotein kodiert. Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist, dass der Impfmischung geeignete Adjuvantien beigegeben werden, die eine zytotoxische Immunantwort hervorrufen, beispielsweise Zytokine der TH1-Antwort, Zytokin-kodierende DNA-Expressionskonstrukte oder immunstimulatorische DNA Sequenzen.

WO 01/04280 A3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 00/02262

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K31/7088 A61K39/21

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, EPO-Internal, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 751 223 A (RHONE MERIEUX) 23 January 1998 (1998-01-23) page 2, line 17 -page 4, line 13 ---	1-7
X	WO 94 06471 A (FRANCIS MICHAEL JAMES ;PITMAN MOORE INC (US)) 31 March 1994 (1994-03-31) page 4, paragraph 3 -page 5, paragraph 2; claim 13 ---	1-5,7,19
X	WO 95 30019 A (WARDLEY RICHARD C ;UPJOHN CO (US); LOWERY DAVID E (US)) 9 November 1995 (1995-11-09) the whole document --- -/--	1-5,7,19

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 December 2000

Date of mailing of the international search report

03/01/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bilang, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 00/02262

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 571 515 A (SCOTT PHILLIP ET AL) 5 November 1996 (1996-11-05) cited in the application the whole document ---	8,11,12, 14,18
X	HOSIE M J ET AL: "DNA vaccination affords significant protection against feline immunodeficiency virus infection without inducing detectable antiviral antibodies." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 72, no. 9, September 1998 (1998-09), pages 7310-7319, XP000944624 the whole document ---	1-7
Y	FEHR D ET AL: "Nucleotide and predicted peptide sequence of feline interleukin-12 (IL-12)." DNA SEQUENCE, (1997) 8 (1-2) 77-82. , XP000944982 the whole document ---	8,11,12, 14,18
Y	CUISINIER A M ET AL: "Attempt to modify the immune response developed against FIV gp120 protein by preliminary FIV DNA injection" VACCINE, GB, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, vol. 17, no. 5, February 1999 (1999-02), pages 415-425, XP004153823 ISSN: 0264-410X page 415 -page 416, column 2, line 2 ---	8,11,12, 14,18
A	LEUTENEGGER C M ET AL: "Molecular cloning and expression of feline interleukin-16." DNA SEQUENCE, (1998 MAR) 9 (1) 59-63. , XP000944981 -----	

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Intern: ☐ Patentsymbole

PCT/DE 00/02262

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K31/7088 A61K39/21

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, EPO-Internal, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FR 2 751 223 A (RHONE MERIEUX) 23. Januar 1998 (1998-01-23) Seite 2, Zeile 17 -Seite 4, Zeile 13	1-7
X	WO 94 06471 A (FRANCIS MICHAEL JAMES ;PITMAN MOORE INC (US)) 31. März 1994 (1994-03-31) Seite 4, Absatz 3 -Seite 5, Absatz 2; Anspruch 13	1-5,7,19
X	WO 95 30019 A (WARDLEY RICHARD C ;UPJOHN CO (US); LOWERY DAVID E (US)) 9. November 1995 (1995-11-09) das ganze Dokument	1-5,7,19
	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. Dezember 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

03/01/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bilang, J

INTERNATIONAL RESEARCHENBERICHT

Intern: ales Aktenzeichen

PCT/DE 00/02262

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	US 5 571 515 A (SCOTT PHILLIP ET AL) 5. November 1996 (1996-11-05) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	8,11,12, 14,18
X	HOSIE M J ET AL: "DNA vaccination affords significant protection against feline immunodeficiency virus infection without inducing detectable antiviral antibodies." JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 72, Nr. 9, September 1998 (1998-09), Seiten 7310-7319, XP000944624 das ganze Dokument	1-7
Y	FEHR D ET AL: "Nucleotide and predicted peptide sequence of feline interleukin-12 (IL-12)." DNA SEQUENCE, (1997) 8 (1-2) 77-82. , XP000944982 das ganze Dokument	8,11,12, 14,18
Y	CUISINIER A M ET AL: "Attempt to modify the immune response developed against FIV gp120 protein by preliminary FIV DNA injection" VACCINE,GB,BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, Bd. 17, Nr. 5, Februar 1999 (1999-02), Seiten 415-425, XP004153823 ISSN: 0264-410X Seite 415 -Seite 416, Spalte 2, Zeile 2	8,11,12, 14,18
A	LEUTENEGGER C M ET AL: "Molecular cloning and expression of feline interleukin-16." DNA SEQUENCE, (1998 MAR) 9 (1) 59-63. , XP000944981	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern: International Application No

PCT/DE 00/02262

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2751223	A	23-01-1998	AU 3699297	10-02-1998
			BR 9710497	17-08-1999
			CZ 9900159	16-06-1999
			EP 0934416	11-08-1999
			WO 9803660	29-01-1998
			PL 331247	05-07-1999
			ZA 9706286	19-01-1999
WO 9406471	A	31-03-1994	AT 175119	15-01-1999
			AU 4826493	12-04-1994
			CA 2143187	31-03-1994
			DE 69322872	11-02-1999
			DE 69322872	27-05-1999
			DK 661999	30-08-1999
			EP 0661999	12-07-1995
			ES 2127294	16-04-1999
			GR 3029264	28-05-1999
			JP 8504090	07-05-1996
			ZA 9306970	29-08-1994
WO 9530019	A	09-11-1995	AU 2234995	29-11-1995
			EP 0758396	19-02-1997
			JP 9512177	09-12-1997
			US 5833993	10-11-1998
US 5571515	A	05-11-1996	US 5723127	03-03-1998
			US 5976539	02-11-1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Aktenzeichen

PCT/DE 00/02262

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
FR 2751223 A	23-01-1998	AU 3699297 A	10-02-1998
		BR 9710497 A	17-08-1999
		CZ 9900159 A	16-06-1999
		EP 0934416 A	11-08-1999
		WO 9803660 A	29-01-1998
		PL 331247 A	05-07-1999
		ZA 9706286 A	19-01-1999
WO 9406471 A	31-03-1994	AT 175119 T	15-01-1999
		AU 4826493 A	12-04-1994
		CA 2143187 A	31-03-1994
		DE 69322872 D	11-02-1999
		DE 69322872 T	27-05-1999
		DK 661999 T	30-08-1999
		EP 0661999 A	12-07-1995
		ES 2127294 T	16-04-1999
		GR 3029264 T	28-05-1999
		JP 8504090 T	07-05-1996
		ZA 9306970 A	29-08-1994
WO 9530019 A	09-11-1995	AU 2234995 A	29-11-1995
		EP 0758396 A	19-02-1997
		JP 9512177 T	09-12-1997
		US 5833993 A	10-11-1998
US 5571515 A	05-11-1996	US 5723127 A	03-03-1998
		US 5976539 A	02-11-1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. Januar 2001 (18.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/04280 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/00

(74) Anwalt: BOECKH, Tobias; Vinck & Hertin, Uhländ-
strasse 173/174, D-10719 Berlin (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/02262

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. Juli 2000 (08.07.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
1258/1999 8. Juli 1999 (08.07.1999) CH

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): MOLOGEN FORSCHUNGS-, ENTWICK-
LUNGS- UND VERTRIEBS GMBH [DE/DE]; Fabek-
strasse 30, D-14195 Berlin (DE). UNIVERSITÄT
ZÜRICH [CH/CH]; Rämistrasse 71, CH-8001 Zürich
(CH).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LEUTENEGGER,
Christian [CH/CH]; Höchstrasse 1, CH-8610 Uster
(CH). SCHROFF, Matthias [DE/DE]; Friedbergstrasse
5, D-14057 Berlin (DE). WITTIG, Burghardt [DE/DE];
Offenbacher Strasse 5, D-14197 Berlin (DE). LUTZ,
Hans [CH/CH]; Im Oberdorf, CH-8455 Rüdlingen (CH).

(54) Title: VACCINE AGAINST LENTIVIRAL INFECTIONS, SUCH AS THE FELINE IMMUNE DEFICIENCY VIRUS OF
THE CAT

(54) Bezeichnung: IMPFSTOFF GEGEN INFEKTIONEN MIT LENTIVIREN, WIE DEM FELINEN IMMUNSCHWÄCHE-VI-
RUS DER KATZE

(57) Abstract: The invention relates to a vaccine which is capable of inducing protection against disease as a result of a lentiviral infection, in particular, infection with the feline immune deficiency virus (FIV). The vaccination can be carried out in such a way, that inoculated animals can be differentiated from diseased or infected animals by the status of their antibodies. A vaccine of this type contains a DNA sequence which contains the envelope glycoprotein and preferably a part of the gene that codes for the transmembrane protein. The invention is also characterised in that suitable adjuvants are added to the vaccine mixture which elicit a cytotoxic immune response, for example cytokine of the TH1 response, cytokine coding DNA expression constructions, or immune-stimulatory DNA sequences.

(57) Zusammenfassung: Es wird ein Impfstoff beschrieben, welcher einen Schutz gegen Erkrankung infolge einer Lentivirusinfektion, insbesondere eine Infektion mit dem feline Immunschwäche-Virus (FIV), zu induzieren vermag und durch den die Impfung so gestaltet werden kann, dass geimpfte Tiere durch ihren Antikörperstatus von erkrankten oder infizierten Tieren unterschieden werden können. Ein solcher Impfstoff enthält eine DNA-Sequenz, welche das Hüllglykoprotein sowie vorzugsweise einen Teil jenes Gens enthält, welches für das Transmembranprotein kodiert. Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist, dass der Impfmischung geeignete Adjuvantien beigegeben werden, die eine zytotoxische Immunantwort hervorrufen, beispielsweise Zytokine der TH1-Antwort, Zytokin-kodierende DNA-Expressionskonstrukte oder immunstimulatorische DNA Sequenzen.

WO 01/04280 A2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Impfstoff gegen Infektionen mit Lentiviren, wie dem feline Immunschwäche-Virus der Katze

Beschreibung

Technisches Gebiet

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf einen Impfstoff, mit dem Katzen gegen die Infektion mit dem feline Immunschwäche-Virus geschützt werden können, insbesondere auf einen Impfstoff auf DNA-Basis.

5 Stand der Technik

Im Jahre 1987 wurde erstmals bei Hauskatzen ein Virus isoliert, welches bei infizierten Tieren zu einer Schwächung des Immunsystems führt (Pedersen et al., 1987). Bei diesem Virus handelt es sich um das feline Immunschwäche-Virus (FIV), welches als Lentivirus zu den Retroviren gehört. Das FIV ist nahe verwandt mit dem humanen Immunschwäche-Virus (HIV), mit dem simian Immunschwäche-Virus der Affen (SIV), mit den Lentiviren des Pferdes (equines infektiöses Anämievirus, EIAV) und der kleinen Wiederkäuer (Maedi-Visna-Virus des Schafes, MVV, und caprines Arthritis-Enzephalitis-Virus der Ziege, CAEV) sowie mit dem bovinen Immunschwäche-Virus des Rindes (BIV). Das FIV führt wie das HIV beim Menschen durch Abnahme der CD4-Lymphozyten im Blut im Verlauf der Erkrankung, sowie damit einhergehend zu einer zunehmenden Schwächung des Immunsystems (Torten et al., 1991). Wenn die Zahl der CD4-Lymphozyten im Blut eine gewisse Grenze unterschritten hat, kommt es zu einem völligen Versagen des Immunsystems, in dessen Folge die Katzen sterben oder eingeschläfert werden müssen. Die FIV-Infektion kommt weltweit vor, nicht nur bei Hauskatzen, sondern auch bei wilden Feliden wie zum Beispiel den Löwen in Ostafrika. Die Häufigkeit der FIV-Infektion bei der Hauskatze variiert allerdings von Land zu Land. In der Schweiz, Deutschland und Österreich sind zwischen 3 und 4 % der erkrankten Katzen, die dem Tierarzt zur Untersuchung vorgestellt werden, mit diesem Virus infiziert. In Frankreich und England sowie gewiss in Gebieten der USA liegt die Rate bei kranken, infizierten Katzen zwischen 10 und 15 %, in Japan kann sie zum Beispiel bis zu 40 % ansteigen. Damit

handelt es sich bei der FIV-Infektion um eine wichtige Krankheit von veterinärmedizinischer Bedeutung. Neben dem tierärztlichen Aspekt ist die FIV-Infektion aber auch für die Humanmedizin von Interesse, da sich diese Infektion aufgrund der großen Ähnlichkeit mit der HIV-Infektion des Menschen als Modell zum Studium der HIV-Infektion und möglicher Prävention und Therapiemöglichkeiten in hohem Masse eignet (Gardner, 1991; Jarrett et al., 1990). Für die Bekämpfung der FIV-Infektion sind Tierärzte und Tierbesitzer bislang ausschließlich auf den Nachweis der Infektion mittels immunologischer Tests und Abtrennung infizierter Tiere von nicht infizierten angewiesen. Eine Impfung, die es erlaubt, Katzen gegen die FIV Infektion zu schützen ohne gleichzeitig Antikörper zu induzieren, die zu falsch-positiven Reaktionen im Test führt, mit dem die FIV Infektion nachgewiesen wird, existiert zur Zeit nicht.

Der natürliche Schutz vor Infektionskrankheiten beruht auf der Wiedererkennung von Strukturen erfolgreich bekämpfter Erreger durch die Zellen des adaptiven Immunsystems. Dabei können zwei Hauptaktivitäten unterschieden werden. Auf der einen Seite ist dies die Aktivität des humoralen Immunsystems, welches auf der Synthese von Antikörpern durch B-Lymphozyten beruht. Neben dem humoralen Immunsystem kennt man auf der anderen Seite das zelluläre Immunsystem, welches auf der Aktivität vor allem von T-Lymphozyten beruht. Diese T-Lymphozyten sind in der Lage, mit Viren infizierte Körperzellen als „fremd“ zu erkennen. Je nach spezieller Funktion der T-Zelle amplifiziert und modifiziert diese dann das Signal der Fremderkennung (T-Helferzellen), oder leitet direkt die Lyse der als fremd oder infiziert erkannten Zelle ein (zytotoxische T-Zellen). Für das Funktionieren der Immunantwort ist die korrekte Kooperation des humoralen mit dem zellulären Immunsystem entscheidend. In den letzten zehn Jahren wurde klar, dass der zelluläre Arm des Immunsystems durch Aktivierung von sog. Typ-1-Helferzellen und der humorale Arm durch Aktivierung von sogenannten Typ-2-Helferzellen induziert wird (Mosmann et al., 1986). Entsprechend dieser Bezeichnung der Helferzellen wird der zelluläre Arm auch als TH1 pathway und der humorale Arm als TH2 pathway des Immunsystems bezeichnet.

Zur Lösung der einleitend geschilderten Probleme wurde auf die Immunisierung mit DNA zurückgegriffen (Ulm & JB et al. 1993). Diese mittlerweile intensiv erforschte Methodik bedient sich der Vakzinierung durch endogen exprimierten Antigene, wel-

- 3 -

che intrazellulär v arbeitet und dem Immunsystem präsentiert werden. Neben bestimmten technischen bzw. ökonomischen Vorteilen, die die Immunisierung mit DNA gegenüber der Herstellung attenuierter oder rekombinanter Impfstoffe bietet, hat der Ansatz eine Reihe biologischer Vorteile. Vor allem fällt darunter die Möglichkeit, durch Ko-expression geeigneter Zytokine oder Beibringung signalvermittelnder Stoffe die Entstehung einer Typ-1 oder Typ-2-Antwort in den Immunzellen selbst zu beeinflussen.

Zur Beibringung der DNA-Expressionskonstrukte ist eine Reihe von Verfahren bekannt. Die der ballistischen Transfektion von Zielzellen ist in den Schriften WO91/00539, EP 0 500 799 beschrieben. Ein Apparat hierzu ist in WO95/19799 offenbart.

Die Impfung durch direkte Injektion nackter DNA ist in US 5,580,859, US 5,589,466 sowie US 5,593,972 offenbart.

Ein Nachteil der im Moment zur DNA-Immunisierung verwendeten Vektoren besteht darin, dass entweder Vektoren viralen Ursprungs eingesetzt werden, welche vom Aspekt der Sicherheit Probleme aufwerfen können (Gunzburg WH und Salmons B, 1995) oder Plasmide eingesetzt werden, die zwar epidemiologisch als vollkommen sicher zu gelten haben und immunologisch viralen Ansätzen weit überlegen sind, die allerdings dennoch Sequenzen enthalten, die zur Wirksamkeit der immunisierenden Expressionskassette keinen Beitrag liefern. Unter diese Sequenzen fallen alle zur Vermehrung in Bakterien benötigten Sequenzen wie Antibiotikaresistenzgene, Replikationsursprünge und ähnliche. Die Problematik wird in WO98/21322 ausführlich diskutiert.

Zudem ist die Entstehung von Immunantworten durch DNA-Immunisierung erheblich von der Menge und Beschaffenheit der inokulierten DNA abhängig. In Abhängigkeit von der Methode der Beibringung erfordert dabei die Immunisierung zwischen $<1\mu\text{g}$ DNA und $>100\mu\text{g}$ DNA bei Mäusen. Bei großen Mengen DNA kann die Anwesenheit von ISS (ISS = immunstimulatorischen Nukleinsäuresequenzen) wie den CpG-Sequenzen (CpG = unmethyliertes Cytosin-Guanosin) im Ampicillinresistenzgen die Qualität der Immunantwort erheblich beeinflussen, die ISS-Motiv wurden überhaupt erst durch in dies kontrollierendes Experiment zufällig gefunden (Krieg et al.

(1995)). So wird bei DNA-Immunisierung mittels „Gene Gun“, bei der sehr geringe Mengen DNA zur Immunisierung in den Körper des Patienten gebracht werden, typischerweise eher ein TH2-Profil der induzierten Immunantwort gefunden, während bei Injektion nackter DNA in den Muskel, bei der viel größere Mengen DNA eingesetzt werden, eher ein TH1-Profil beobachtet wird.

In bezug auf die immunstimulatorischen Nukleinsäuresequenzen („ISS“) ist seit einigen Jahren bekannt, dass bestimmte kurze Nukleinsäuresequenzen eine erhebliche physiologische Wirkung aufweisen können, indem sie über bisher unbekannte Mechanismen Effektorzellen des Immunsystems stark stimulieren. Diese ISS sind nur einige Basen lang und wirken nicht über die Expression von auf ihnen kodierten Proteinen. Die meisten bekannten immunmodifizierenden kurzen Oligodesoxyribonukleotidsequenzen („ODN“) enthalten ein unmethyliertes Cytosin-Guanosin-Motiv (CpG-Motiv). Es wird angenommen, dass die Erkennung dieses Motivs durch bisher nicht aufgeklärte Erkennungsmechanismen in der eukaryoten Zelle zu einer Art Notrufmechanismus führt, der eine gegen virale oder bakterielle Erreger gerichtete Reaktion auslöst (siehe ausführlich auch hinsichtlich weiterer Literaturzitate WO98/1810). Gemäß diesem Erklärungsvorschlag soll die Erkennung von CpG-Motiven, deren Vorkommen im Genom von Eukaryonten gegenüber dem von Prokaryonten erheblich unterdrückt ist, dem höheren Tier als „Warnsignal“ dienen. Das Vorhandensein der CpG-Motive signalisiert nach dieser Theorie eine Infektion durch prokaryote Erreger, und deren Erkennung ermöglicht eine Bekämpfung unabhängig von bzw. vor der Ausbildung einer T-Helferzell-vermittelten Immunantwort. Die T-Helferzell-unabhängige Stimulierung und Proliferation von B-Zellen wird dadurch ermöglicht, dass für T-Zell- und B-Zell-Aktivierung notwendige kostimulatorische Signale, vor allem die Sekretion von Cytokinen der zellulären Typ 1-Antwort (TH1-spezifische Cytokine wie Interferon gamma, IL-2, IL-12), durch die CpG-abhängigen Signalwege bereitgestellt werden. Außerdem wird durch ISS die Aktivität von NK-Zellen und Makrophagen erhöht. Die Aktivität der Typ-2 Cytokine (IL-4, IL-10) wird demgegenüber unterdrückt, wahrscheinlich durch einen Antagonismus zwischen TH1- und TH2-Antwort (Lipford et al. 1997, Chu et al. 1997).

Es ist für HIV und andere Lentiviren postuliert worden, dass der Verlauf der Infektion wesentlich von der offenbar sehr früh nach Viruskontakt getroffenen „Entscheidung“ des Immunsystems für eine Typ1- oder Typ2-Antwort abhängt (Romagnani et al.,

1994). So findet man bei Patientengruppen, die nach Infektion relativ lang eine hohe CD4-Helferzellzahl im Blut zeigen, auch hohe zytotoxische Aktivität gegen HIV-spezifische Antigene. Es ist auch bei einigen, wahrscheinlich mit dem Virus in Kontakt gekommenen Patienten, die dennoch HIV-Antikörper-negativ blieben, ebenfalls eine HIV-spezifische Typ-1-Antwort gezeigt worden. Dies führte zu der Vermutung, dass die Induktion einer zytotoxischen Antwort gegen lentivirale Antigene im Wege einer Impfung die Infektion mit den entsprechenden Erregern verhindern könne. Ein Beweis dieser Vermutung – resp. ein tauglicher Impfstoff – ist allerdings bisher nicht geliefert worden.

Aus dem Gebiet der Forschung zur humanen HIV-Infektion ist bekannt geworden, dass die Expression oder Blockade bestimmter Chemokinrezeptoren den Verlauf der Infektion der Zielzellen erheblich beeinflussen kann (Mackewicz CE, et al.1996). Es wurde weiterhin vermutet, dass auch die Expression von IL-16 zur Inhibition der HIV-Replikation beitrage und damit einen Beitrag zu einer möglichen Schutzwirkung liefern könne (Idziorek T, et al., 1998; Amiel et al. ,1999; Zhou et al.,1997)

Einen Impfstoff, mit dem Katzen unter Feldbedingungen gegen diese Infektion geschützt werden können und der mit dem Nachweisverfahren der Infektion nicht interferiert, gibt es – trotz zahlreicher Versuche – zur Zeit nicht. Es wurde versucht, Katzen gegen die FIV-Infektion zu impfen unter Verwendung von FIV-infizierten, in Kultur vermehrten Zellen, die vor Injektion mit Formalin inaktiviert wurden (Yamamoto et al., 1993; Yamamoto et al., 1991, siehe auch Yamamoto: US 5,275,813, 4.1.94, sowie US 5,510,106, 23.4.96). Eine ähnliche Erfindung ist auch aus Tompkins et al., US 5,413,927, bekannt. Solchermaßen geimpfte Katzen entwickelten jedoch Antikörper gegen die verschiedenen Virusproteine des FIV. Diese Antikörper reagieren mit den heute eingesetzten diagnostischen Verfahren (Tonelli, 1991), weshalb bei einer solchen Katze aufgrund eines Tests nicht unterschieden werden kann, ob die Katze an einer Infektion leidet oder vakziniert worden war. Um einen Impfstoff zur Verfügung zu haben, der bei den geimpften Tieren nicht zu einem falsch-positiven Test führt und damit keine vorbestehende Infektion mit dem FIV vortäuschen soll, wurde von verschiedenen Gruppen seit Jahren versucht, durch Verwendung eines mit Verfahren der Gentechnologie hergestellten Hüllglykoproteins des FIV und unter Einbezug geeigneter Adjuvantien einen Impfstoff zu entwickeln. Ein Erfinder der vorliegenden Anmeldung hatte dabei die ersten Experimente in dieser Richtung un-

temom n. Die ersten Versuche schützten zwar nicht vor einer Testinfektion, lie-
ßen aber erkennen, dass bei vakzinierten Tieren eine partielle Immunität vorgelegen
hatte (Hofmann-Lehmann et al., 1995; Lutz et al., 1995). Ein späteres Experiment
führte zu einem klar objektivierbaren Teilschutz bei einer der geimpften Gruppen
5 (Leutenegger et al., 1998; Lutz et al., 1996). Ein weiteres Experiment, in welchem
Katzen mit rekombinantem FIV-Hüllglykoprotein vakziniert wurden, welches vorgän-
gig mit Lymphozyten zusammen mit Formalin inaktiviert worden war und unter Ver-
wendung verschiedener Adjuvantien zur Immunisierung eingesetzt wurde, zeigte
keinen Erfolg (Boretti and F., 1999). Die Arbeit anderer Forschergruppen über die
10 Verwendung von rekombinantem Hüllglykoprotein als Vakzine-Antigen ist umfas-
send dokumentiert (Huisman et al., 1998; Osterhaus et al., 1996; Richardson et al.,
1997). Allerdings gelang es auch diesen bislang nicht, unter Verwendung solcher
Hüllglykoproteine oder der dafür kodierenden DNA einen Schutz zu erzielen
(Osterhaus et al., 1996; Richardson et al., 1997; Richardson et al., 1998).

15 Rekombinante Impfstoffe gegen FIV sind weiterhin aus dem Patent von Wasmoen
et al., US 5,849,303 bekannt.

Die Verwendung von IL-12 als Adjuvans bei Menschen ist aus US 5,571,515 be-
kannt.

20 Die Lehre von Gebrauch und Herstellung immunstimulatorischer, CpG-
enthaltender ISS ist in der Anmeldung WO 98/18810 sowie den darin zitierten
Schriften umfassend erläutert.

Kovalent geschlossene hantelörmige Expressionskonstrukte aus DNA sind aus Wit-
tig et al. (WO 98/21322) bekannt. Der Offenbarungsgehalt aller genannten Schriften
soll als Teil der hier vorgelegten Beschreibung angesehen werden.

25 Trotz der vielen Arbeiten auf diesem Gebiet, gibt es bisher noch keinen guten und
nachweisbaren Impfschutz für Katzen vor Infektion mit FIV.

Ziel und Aufgabe d r vorliegenden Erfindung ist es d shalb, einen Impfstoff für Feli-
d bereitzustellen, welcher einen Schutz gegen Erkrankung infolge von FIV-
Infektion zu induzi ren vermag, wobei die Impfung vorzugsweise so zu g stalten

war, dass geimpfte Tiere durch ihren Antikörperstatus von erkrankten oder infizierten Tieren unterschieden werden können.

Darstellung der Erfindung

Erfindungsgemäß wird dieses Ziel dadurch erreicht, dass Tiere, insbesondere Säugetiere wie Katzen, mit einer DNA-Sequenz immunisiert werden, welche das Hüllglykoprotein sowie einen Teil jenes Gens enthält, welches für das Transmembranprotein kodiert. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden der Impfmischung geeignete Adjuvantien beigegeben, die eine zytotoxische Immunantwort hervorrufen, beispielsweise Zytokine der TH1-Antwort, Zytokin-kodierende DNA-Expressionskonstrukte oder immunstimulatorische DNA Sequenzen.

Zur Lösung der einleitend geschilderten Probleme wurde auf die Immunisierung mit DNA zurückgegriffen, zu der bereits oben Ausführungen gemacht worden sind (siehe z.B. Ulmer JB et al. (1993), WO91/00539, EP 500799, WO95/19799, US 5,580,859, US 5,589,466 sowie US 5,593,972).

Die erfindungsgemäße Vakzine zur Schutzimpfung oder Therapie einer Lentiviren-Infektion, insbesondere der FIV-Infektion bei Katzen, zeichnet sich aus durch das Vorhandensein einer immunisierenden Polynukleotidsequenz, die mindestens einen Teil des Gens des Hüllproteins (env-Gen) des entsprechenden Lentivirus, insbesondere des FIV, unter der Kontrolle eines in dem entsprechenden Tier, insbesondere Katzen, operablen eukaryonten Promoters enthält oder daraus besteht. Mindestens ein Teil des env-Gens bedeutet, dass ein oder mehrere Teile des env-Gens oder auch das ganze env-Gen vorhanden sind. Die Teile des env-Gens müssen zumindest einen so großen Teil des Hüllproteins codieren, dass eine Immunantwort hervorgerufen wird.

Eine solche Vakzine enthält vorzugsweise eine immunisierende Polynukleotidsequenz mit der die extrazellulär resp. außerhalb des Virus gelegene Domäne des env-Genprodukts sowie mindestens zwanzig Aminosäuren des Transmembrananteils des env-Genprodukts kodierenden Sequenz.

- 8 -

Nukleotidsequenzen, die in d r vorliegenden Erfindung verwendbar sind und im Rahmen der Beispiele verwendet wurden, sind in SEQ ID NO 1 (FIV gp140), SEQ ID NO 2 (IL-12p40), SEQ ID NO 3 (IL-12p35), SEQ ID NO 4 (IL-16), SEQ ID NO 5 (CpG) und SEQ ID NO 6 (CpG) in einem gesonderten Sequenzprotokoll zu finden.

- 5 Eine bevorzugte Vakzine enthält als minimalen Teil der immunisierenden Polynukleotidsequenz, die unter SEQ ID NO 1 angegebene Sequenz oder eine mit der unter SEQ ID NO 1 angegebenen Sequenz zu mindestens 85% identische Sequenz oder eine Sequenz, die ohne die Entartung des genetischen Codes mit der in SEQ ID NO 1 angegebenen Sequenz zu mindestens 85 % identisch ist. Die Ähnlichkeit
10 auf Nukleinsäurebasis wurde mit dem Programm MacMolly Complign Version 3.8 (www.molgen.com) und den Parametern „gap penalty = 3“ sowie „mismatch penalty = 1“ berechnet.

Selbstverständlich schließen die oben angegebenen Sequenzen auch die Komplementärsequenzen ein.

- 15 In einer Ausführungsform der Erfindung enthält die Vakzine zusätzlich mindestens eine und bevorzugt zwei Hilfs-Polynukleotidsequenzen. Diese Hilfs-Polynukleotidsequenz enthält die für IL-12 codierende Sequenz, insbesondere – für die Behandlung von Feliden, speziell Hauskatzen - die für beide Untereinheiten des feline IL-12 codierende Sequenz, unter der Kontrolle eines oder mehrerer im entsprechenden Tier operablen eukaryonten Promoters, und/oder die für IL-16 codierende Sequenz, insbesondere – für die Behandlung von Feliden, speziell Hauskatzen – die für das feline IL-16 codierende Sequenz, unter der Kontrolle eines im entsprechenden Tier operablen eukaryonten Promoters.
20

- 25 In einer weiteren Ausführungsform der Vakzine kann diese die für IL-12 codierenden Sequenzen, z.B. die Sequenzen, die für die beiden Untereinheiten des feline IL-12 codieren, und die Sequenz, die für IL-16, z.B. das feline IL-16, codieren in der gleichen Hilfs-Polynukleotidsequenz und unter der Kontrolle eines oder mehrerer im entsprechenden Tier, z.B. der Katze, operablen eukaryonten Promoter enthalten.

- 30 In einer weiteren Ausführungsform enthält die Vakzin eine Hilfs-Polynukleotidsequenz, welche mindestens eine Sequenz der Basenfolge

$N^1N^2CGN^3N^4$ aufweist, wobei N^1N^2 ein Element aus der Gruppe GT, GG, GA, AT oder AA und N^3N^4 ein Element aus der Gruppe CT oder TT bedeutet. Dabei haben C, G, A und T die übliche Bedeutung, nämlich C Cytosin, G Guanin, A Adenin und T Thymin. Im anschließenden Beispiel wurde 5'-phosphoryliertes Oligodesoxynukleotid der Sequenz 5'-GTTCTTCGGG GCGTTCTTTT TTAAGAACGC CCC (SEQ ID NO 5) sowie ebenfalls 5'-phosphoryliertes Oligodesoxynukleotid der Sequenz 5'-GAAGAACGTT TTCCAATGAT TTTTCATTGG AAAAC (SEQ ID NO 6) in äquimolaren Mengen in einer Gesamtkonzentration von 1 mg DNA pro ml Lösung mit T4-DNA-Ligase in Anwesenheit von 1 mM ATP umgesetzt. Nach vollständiger Ligation wurden nichtumgesetzte Edukte durch Reaktion mit T7-DNA-Polymerase in Abwesenheit von dNTPs verdaut und das Produkt nach Reinigung über Anionen-Austausch-HPLC erhalten.

Bevorzugte Sequenzen, die in der Vakzine, insbesondere für die Behandlung von Katzen, enthalten sein können sind die Sequenzen gemäß SEQ ID NO 2 (IL-12), SEQ ID NO 3 (IL-12), SEQ ID NO 4 (IL-16), SEQ ID NO 5 (CpG) oder SEQ ID NO 6 (CpG).

Die Polynukleotidsequenzen resp. Expressionskonstrukte, sowohl der immunisierenden als auch der Hilfs-Polynukleotidsequenz können aus kovalent geschlossenen linearen Desoxyribonukleinsäuremolekülen bestehen, welche einen linearen Doppelstrangbereich aufweisen und welche doppelstrangbildenden Einzelstränge durch kurze einzelsträngige Schleifen aus Desoxyribonukleinsäurenukleotiden verknüpft sind. Solche Konstrukte bestehen vorzugsweise nur aus der kodierenden Sequenz unter Kontrolle eines im Impfling operablen Promotors und einer Terminatorsequenz.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Impfung oder Therapie der Lentivireninfektion, insbesondere der FIV-Infektion bei Katzen, die dadurch gekennzeichnet ist, dass Polynukleotidsequenzen, wie sie oben beschrieben wurden, auf einem geeigneten Trägermaterial aufgebracht, auf die Haut des Tieres, insbesondere der Katze, beschleunigt wird, in die Zellen der Haut des Tieres eindringt und dort exprimiert wird. Ein bevorzugtes Trägermaterial ist Gold, wobei aber auch andere, massenreiche und inerte Materialien geeignet sind.

Neben der oben beschriebenen Impfmethode für die Applikation der erfindungsgemäßen Impfstoffzusammensetzungen können auch andere Applikationsmethoden eingesetzt werden, bei denen die in der Diskussion des Stands der Technik beschriebenen Nachteile zumindest zum Teil vermindert und vorzugsweise nicht vorhanden sind. Solche Applikationsmethoden sind beispielsweise Verabreichung der Polynukleotidsequenzen in wässriger Lösung z.B. durch Injektion in die Muskulatur.

Da die Rolle einer zytotoxischen Antwort theoretisch als wichtig angesehen wird und die Entstehung einer solchen Antwort von einer effizienten Genexpression mit möglichst geringer Beteiligung inadwertent exprimierter Proteine provoziert werden sollte, wurde im Rahmen des nachfolgenden Beispiels die Beibringung der Vakzine mittels ballistischem Transfer in Form von minimalistischen DNA-Expressionskonstrukten als gegenwärtig bevorzugte Beibringungsmethode verwendet.

Ziel des mittels des ballistischen Transfers durchgeführten Versuches war es, die Entwicklung der Immunantwort soweit wie möglich hinsichtlich der Komponenten zu differenzieren, die den essentiellen Beitrag zur Schutzwirkung liefern. Diese Aufgabe ist bei der Katze weitaus schwerer zu lösen als beispielsweise beim Menschen oder der Maus. Es kann bei immunologisch gut erforschten Spezies z.B. über die Typisierung der im Laufe der Impfung entstehenden Antikörper (IgG Subtyp 1 ist Immunantwort-Typ-2-spezifisch, Subtyp IgG2b ist Typ-1-spezifisch) viel über den zugrunde liegenden Antworttyp ausgesagt werden. Wenn man von der Tragfähigkeit des Typ-1/Typ-2-Paradigmas ausgeht, liefert diese Information Aufschlüsse hinsichtlich der Wirksamkeit und Richtung einer Vakzinierung, auch ohne dass ein Versuch der Infektion und Überprüfung des Schutzes stattgefunden hätte. Auf diese Weise lässt sich die bevorzugte Komposition und Beibringungsmethode zum Erreichen einer hypothetisch prophylaktischen Immunantwort mit viel geringerem Aufwand erreichen, als wenn jede Modalität der Impfung mit einem Infektions-/ Schutzexperiment untersucht wird. Es ist bei der Katze beim gegenwärtigen Wissensstand leider nicht möglich, solche Voraussagen mit dem gleichen Grad an Sicherheit zu treffen, wie dies bei Spezies wie dem Menschen oder der Maus der Fall wäre. Selbst grundlegende Paradigma wie die Typ1-Typ2 Dichtomie sind für die Katze nicht belegt. Die große Übereinstimmung vieler grundlegender Immuncharakteristika zwischen Mensch und Maus ist in vielen Fällen auf diese beiden Spezies be-

schränkt und nicht auf andere übertragbar. Um so überraschender war der große Erfolg der hier probierten Regime.

Eine erfindungsgemäße Vakzine kann anstelle von Polynukleotiden auch Proteine resp. Glykoproteine enthalten, welche durch die in der vorliegenden Anmeldung, z.B. im Beispiel 1, beschriebenen Nukleotidsequenzen oder ähnliche Sequenzen kodiert werden. Ein auf Proteinbasis beruhendes Vakzineexperiment wurde in der Arbeit von Leutenegger et al (1998) im Detail beschrieben. In jenem Beispiel gelang es zwar, unter Verwendung eines handelsüblichen Adjuvans (QS-21) bei einigen Katzen einen Teilschutz zu erzielen, die Resultate waren aber unbefriedigend. Durch den Zusatz von Zytokinen (IL-12 und/oder IL-16) in der Form von Proteinen als Adjuvantien, gemäss der vorliegenden Erfindung, kann die Wirkung von Vakzinen auf Proteinbasis wesentlich verstärkt werden. Für solche Vakzinen geeignete Proteine, z. B. Proteine des FIV oder immunisierende Teile derselben, sowie die Zytokine IL-12 und IL-16 können in Bakterien (z.B. E.coli), in Hefen, in Säugerzellen (z.B. CHO-Zellen), in Insektenzellen (z.B. Zellen von *Heliothis zea*, ATCC No. CRL-9281) oder in Pflanzen (z.B. Tabakpflanze) exprimiert und daraus gereinigt werden.

Weitere vorteilhafte Maßnahmen sind in den übrigen Unteransprüchen enthalten. Die Erfindung wird nun anhand eines konkreten Beispiels, das die in den Ansprüchen definierte Erfindung aber in keiner Weise einschränken soll, sowie in den Figuren, weiter erläutert. Es zeigt.

Figur 1 zeigt die Resultate der FIV-RNA Quantifizierung im Plasma der Katzen.

Ausführungsbeispiele

Es wurden fünf Impfrezimes formuliert. Grundantigen in allen Gruppen (mit Ausnahme der Kontrollgruppe) war das gp140-SU-Antigen, das Hauptprodukt des env-Genes des FIV.

Das hier erwähnte Genkonstrukt soll generell als gp140-DNA bezeichnet werden. Um die Nützlichkeit dieses gp140-DNA-Konstruktes zu prüfen, wurde folgendes Experiment angestellt: Es wurden sechs Gruppen à je vier Katzen eingesetzt, die

mit verschiedenen Präparationen von gp140-DNA und ggf. DNA-kodierten Adjuvantien, in einem Fall auch nicht-kodierender adjuvanter DNA, immunisiert wurden. Die DNA-Konstrukte waren die oben erwähnten minimalistischen Expressionskonstrukte, bestehend lediglich aus der kodierenden Sequenz, vor welche noch die Sequenz des Zytomegalo-Virus-Promotors (CMV) gestellt worden war. Die kodierende Sequenz und der CMV-Promotor wurden als lineare Doppelstrangmoleküle verwendet, die beidseitig kovalent abgeschlossen wurden, um einer extra- oder intrazellulären Degradation durch Exonukleasen vorzubeugen. Die DNA-Konstrukte wurden auf kleine Goldpartikel adsorbiert, welche direkt in die Haut der Versuchstiere eingeschossen wurden. Die Tiere wurden dreimal im Abstand von drei Wochen mit den entsprechenden Konstrukten beschossen, wobei die DNA pro Schuss auf 1 mg Gold aufgezogen wurde. Zur Immunisierung wurde eine Helios gene-gun (Biorad, München, D) und ein Druck von 500 psi verwendet. Die gesamte DNA-Dosis betrug 2 µg pro Tier pro Impfung. Vier Wochen nach der dritten Immunisierung wurden die Tiere einer Testinfektion mit dem für die Gewinnung des Vakzineantigens verwendeten FIV-Stamm (Stamm Zürich 2, (Morikawa et al., 1991)) infiziert. Als Infektionsdosis für die Testinfektion wurde die 25fache Menge jener Konzentration verwendet, welche bei 50 % der Katzen zur Infektion führen würde (cat infective dose 50 = CID₅₀). Bei den verschiedenen Gruppen handelte es sich um die folgenden:

Tabelle 1 Zusammensetzung der Vakzinegruppen

Gruppe Nr.	Vakzine enthält:	Fragestellung
1	nur Goldpartikel	negative Kontrollen, bei diesen Katzen wurde kein Schutz erwartet
2	gp140-DNA	Wirksamkeit des gp140-DNA-Konstrukts allein
3	gp140-DNA + IL-12-DNA	Abklärung der Wirkung von IL-12 im Vergleich zur Gruppe 2
4	gp140-DNA + IL-16-DNA	Abklärung der Wirkung von IL-16 im Vergleich zur gp140-DNA allein (Gruppe 2)
5	gp140-DNA + IL-12-DNA + IL-16-DNA	Abklärung des kombinierten Effektes der IL-12- und IL-16-DNA im Vergleich zur Gruppe 3 respektive Gruppe 4
6	gp140-DNA + CpG	Abklärung des Effektes von CpG

Der Schutzeffekt der verschiedenen Vakzine-Präparationen wurde durch Messung der folgenden Parameter jeweils in wöchentlichen Abständen bestimmt (Ausnahme: Messung des RNA Loads, nur in Woche 5):

1. Antikörper gegen das Transmembran-Prot in (TM) wurden mittels eines ELISA-Verfahrens bestimmt.
2. Die Menge der FIV-RNA im Plasma dieser Katzen wurde mittels eines TaqMan®-PCR-Verfahrens bestimmt.
- 5 3. Die Menge der in die DNA der Lymphozyten eingebauten FIV-DNA, die sogenannte Provirus-DNA, wurde mittels eines TaqMan®-Verfahrens bestimmt (Leutenegger et al. 1999).

Die Resultate können wie folgt zusammengefasst werden:

- 10 1. *Serokonversion gegen TM*: Der Verlauf der Serokonversion ist in Tabelle 2 zusammengefasst.

Daraus geht hervor, dass die Tiere der Kontrollgruppe 1 außerordentlich stark serokonvertierten, was auf eine hohe Virusreplikationsrate schließen lässt. Ab der fünften Woche waren hier vier von vier Tieren seropositiv.

15 In der Gruppe 2 kam es nur allmählich zur Serokonversion, und der Grad der Serokonversion war wesentlich geringer als in der Gruppe 1. In der Gruppe 2 waren auch noch in der neunten Woche nicht alle Tiere seropositiv. Dies lässt auf eine verringerte Virusvermehrung schließen, was mit einem Schutz vereinbar ist.

20 In der Gruppe 3 serokonvertierte bis in die siebte Woche lediglich ein Tier, die anderen blieben völlig negativ. Dies deutet darauf hin, dass bei drei von vier Tieren ein kompletter Schutz erzielt worden ist. Beim einen positiven Tier kam es aufgrund der im Vergleich zu den Tieren der Gruppe 1 verringerten Serokonversion nur zu einer mäßigen Virusvermehrung.

25 In der Gruppe 4 serokonvertierten bis zur siebten Woche zwei von vier Tieren. Auch hier kam es nur zur Bildung geringer Antikörpermengen, was ebenfalls auf eine geringgradige Virusvermehrung schließen lässt. Die Kombination von IL-12 und IL-16 erwies sich dagegen – was die Serokonversi-

onsrate anbelangt – als weniger wirksam. Hi r zeigten bis zur siebten Woche vier von vi r Tieren Serokonversion.

Für die Gruppe 6 gilt die gleiche Aussage wie für die Gruppe 5. Auch hier serokonvertierten vier von vier Tieren bis zur siebten Woche.

5 Tabelle 2 FIV Vakzine Experiment, TM-ELISA Resultate

Katze	Gruppe	Wochen nach Testinfektion												
		-7	-5	-3	0	1	2	3	4	5	6	7	8	10
2916	1	0,7	0	0	0	0,3	0,1	0	1,6	70,9	92,2	86,2	85,9	85,9
2932		1,2	0,3	0,2	0	0,8	0,4	0	1,6	59,8	78,6	96,2	65,6	65,6
381		0,6	1,3	0,1	0	0,4	0,2	0	5,3	78	95,3	72,6	89,3	89,3
384		0	1	0,1	0	0,4	0,7	0	10,7	83,8	90,7	78,7	79,4	79,4
2924	2	0	0,3	0	0	0,04	0,8	0,4	1,9	76,4	94,3	88,7	88,3	88,3
2947		0	1	0,5	0	0,4	0,6	0	0	0,4	1,3	0	60,4	60,4
379		0,6	0,9	0,1	0	0	0,4	0	0,4	0,8	16,7	31,6	82,4	82,4
393		0	0,3	0	0	0	0	0	0,8	66,7	85,7	63,6	90	90
2917	3	0	1,2	0,2	0	0	0,2	0	0	0,1	1,1	0	0,9	0,9
2943		0	0,8	0	0	0	0,8	0	0	0	0,9	0	0,8	0,8
377		1	2,4	2,3	0	2,6	0,4	0	1,6	0	2,1	0	0,5	0,5
388		0	0,2	0	0	0,4	0,1	0	0	54,6	86,6	68,8	80,1	80,1
2922	4	0	0,5	0	0	0,5	0	0	0	0	2,6	0	1,1	1,1
2933		0	0,7	0	0	0,3	0,1	0	0	6,7	88,2	86,6	80,4	80,4
382		0,7	1,4	1,4	0	0	0,7	0	1	0,1	1,4	3	64,3	64,3
394		0,2	1	0,4	0	0	0,3	0	0,4	0,05	39,9	45,7	74,6	74,6
2923	5	0	0,2	0	0	0	0,2	0	0,9	2,6	49,4	41,3	74,4	74,4
2959		0,08	0,6	0	0	0	0,3	0	47,5	88,5	97,2	93,4	79,1	79,1
378		0,4	1,9	0,2	3,6	0	0,3	0	2,9	50	99,2	77,4	81,6	81,6
389		0,08	0,2	0	0	0	0,2	0	0,3	38,3	89,4	73,3	97,8	97,8
2925	6	0,08	0,6	0	0,8	0	0,1	0	5	63,1	80	68	79,4	79,4
2936		0,3	1,2	0,2	0	0	0,4	0	0	8,1	61,2	64,2	60,2	60,2
380		1,4	7,4	0,1	0	0	0,4	0	0	1,3	70,3	56,8	71,8	71,8
385		1,6	9,5	1,2	0	0,7	0,2	0	1,3	9,7	108,3	65,4	87,2	87,2

2. *FIV-RNA-Virusload im Plasma:* Die Resultate der FIV-RNA-Quantifizierung im Plasma der Katzen sind in Figur 1 zusammengestellt. Die Resultate können wie folgt kommentiert werden:

Gruppe 1: Hier war der RNA-Virusload am höchsten.

Gruppe 2: Die mit der gp140-DNA vakzinierten Katzen zeigten einen signifikant geringeren RNA-Virusload als die Tiere der Kontrollen; daraus kann ab-

geleitet werden, dass alle in der gp140-Konstruktion schon einen Teilschutz zu induzieren vermag. Diese Resultate sind in Übereinstimmung mit der Serologie.

5

Gruppe 3: Zufügung von IL-12 zur gp140-DNA zeigte bis zur fünften Woche einen vollständigen Schutz der Katzen gegen Virus im Blut. Auch diese Resultate stimmen mit den Beobachtungen der Serologie überein.

Gruppe 4: Die Zugabe von IL-16-DNA führte ebenfalls zu einem eindrucklichen Schutz, indem bis zur fünften Woche auch hier keine Viren im Plasma nachgewiesen werden konnten.

10

Gruppe 5: Die Zugabe von IL-12 und IL-16 erwies sich als weniger gut als IL-12 oder IL-16 allein. In der fünften Woche konnten bei drei von vier Tieren RNA im Plasma nachgewiesen werden. Allerdings war auch hier die Menge gegenüber den Kontrollkatzen der Gruppe 1 signifikant geringer.

15

Gruppe 6: Die Verwendung der CpG zeigte ebenfalls einen Teilschutz auf. Allerdings ließen sich in der fünften Woche bei allen Tieren geringe Mengen von FIV-RNA nachweisen.

3. *Menge der proviralen DNA:* Die Resultate der Quantifizierung der proviralen DNA-Menge aller Katzen ist in Tabelle 3 zusammengestellt. Die Resultate lassen sich wie folgt kommentieren:

20

Gruppe 1: Wie bei der Serologie und der RNA-Messung erwiesen sich auch hier die Tiere der Gruppe 1 als voll empfänglich für die Testinfektion.

Gruppe 2: Auch die Tiere der Gruppe 2 wurden ausnahmslos Provirus-positiv, die mittlere FIV-Provirus-Menge war jedoch nur unwesentlich geringer als jene der Kontrollgruppe.

25

Gruppe 3: Wie zuvor für die Serologie und die RNA-Menge beobachtet, erwies sich auch hier die Menge der proviralen DNA als am geringsten. Nur 1

von 4 Tieren wurde Provirus-positiv, die anderen 3 wurden überhaupt nicht infiziert.

Gruppe 4: Auch die IL-16-DNA führte zu einem verminderten Provirus-Load, der auch in der sechsten Woche noch signifikant geringer war als jener der Kontrolle.

Gruppe 5: Erstaunlicherweise erwies sich der Provirus-Load bei Tieren, die die Kombination von IL-12 und IL-16 erhalten hatten, als sehr gering. Daraus kann abgeleitet werden, dass IL-12 und IL-16 auf die Integration der Provirus-Menge einen signifikanten Schutzeffekt aufweist.

Gruppe 6: Erstaunlicherweise war der Effekt der CpG-Zugabe auf die Provirus-Menge ebenfalls außerordentlich ausgeprägt. In der sechsten Woche ließen sich nur Spuren von integriertem Provirus nachweisen. Diese Resultate stehen etwas im Widerspruch zu den Befunden der RNA-Messung. Sie lassen sich eventuell dadurch erklären, dass CpGs mithelfen, eine Integration des Virus in die DNA der Wirtszelle zu hemmen.

- 17 -

Tabelle 3 *Provirus-Load bei den einzelnen n Katzen*

Vakzine Katze		Testinfekt.	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4	Woche 5	Woche 6	Woche 8	Woche 10
Gold	2916Y	0,00	0,00	0,00	0,00	720,65	2036,35	3250,62	2150,45	617,83
	2932Y	0,00	0,00	0,00	0,00	471,70	736,38	11649,83	490,65	570,69
	0381Y	0,00	0,00	0,00	0,00	1674,35	5853,32	9818,22	1676,30	2080,08
	0384Y	0,00	0,00	0,00	0,00	114,12	796,11	9393,60	9042,02	1570,48
gp140	2924Y	0,00	0,00	0,00	0,00	1867,55	5395,20	6378,60	17906,93	2661,38
	2947Y	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8782,45	949,53	711,82
	0379Y	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	7096,10	34,97	205,24
	0393Y	0,00	0,00	0,00	0,00	344,56	1470,99	6683,63	709,22	2449,24
gp140 IL-12	2917Y	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2943Y	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0377Y	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0388Y	0,00	0,00	0,00	-	4555,94	4644,27	451,29	429,79	263,25
gp140 IL-16	2922Y	0,00	0,00	0,00	0,00	132,90	0,00	0,00	0,00	0,00
	2933Y	0,00	0,00	0,00	0,00	1169,13	-	3495,44	2205,85	1856,62
	0382Y	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2754,58	-	1747,65
	0394Y	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	1789,69	915,75	923,14
gp140 IL-12 / IL-16	2923Y	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	2347,99	-	3134,67
	2959Y	0,00	0,00	0,00	7,24	2493,99	525,81	0,00	581,62	501,54
	0378Y	0,00	0,00	0,00	8,84	352,15	696,76	517,04	0,00	240,05
	0389Y	0,00	0,00	0,00	0,00	-	3963,26	592,80	2307,76	462,34
gp140 CpG	2936Y	0,00	0,00	0,00	0,00	31,33	232,77	333,68	7,98	82,91
	2925Y	0,00	0,00	0,00	0,00	19,12	51,55	101,89	-	-
	0380Y	0,00	0,00	0,00	0,00	94,31	0,00	8,57	8,24	5,49
	0385Y	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	89,10	337,48	96,46	174,80

-: nicht bestimmt

- 5 Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass überraschenderweise festgestellt wurde, dass die Verwendung von gp140-DNA und verschiedener Zusätze einen unterschiedlich hohen Schutzeffekt zu induzieren vermag. Der Schutzeffekt äußert sich einerseits in einer geringeren Virusreplikation, was zu geringem oder vollständigem Fehlen der Serokonversion führt und/oder zu geringerer Integration der viralen DNA in die Wirtszell-DNA.

Lit raturverz ichnis

- Amiel C, Darcissac E, Truong MJ, Dewulf J, Loyens M, Mouton Y, Capron A, Bahr GM; (1999) Interleukin-16 (IL-16) inhibits human immunodeficiency virus replication in cells from infected subjects, and serum IL-16 levels drop with disease progression. *J Infect Dis*, 179(1):83-91
- 5 Boretti and F. (1999) Experimentelle Immunisierung von Katzen mit rekombinanten Hüllglykoproteinen des Feline Immunschwächevirus: Einfluss verschiedener Impfstoffformulierungen auf die Immunantwort und Vergleich mit einer Ganzvirusvakzine. Vet.-Diss. Zürich, .
- 10 Chu, R.S., Targoni, O.S., Krieg, A.M., Lehmann, P.V. and Harding, C.V. (1997) CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *Journal of Experimental Medicine* 186(10), 1623-31
- Gardner, M.B. (1991) Simian and feline immunodeficiency viruses: animal lentivirus models for evaluation of AIDS vaccines and antiviral agents. [Review] [82 refs]. *Antiviral Research* 15(4), 267-86.
- 15 Gunzburg WH, Salmons B, (1995) Virus vector design in gene therapy. *Mol Med Today* 1(9):410-7)
- Hofmann-Lehmann, R., Holznagel, E., Aubert, A., Bauer-Pham, K. and Lutz, H. (1995) FIV vaccine studies. II. Clinical findings, hematological changes and kinetics of blood lymphocyte subsets. *Veterinary Immunology & Immunopathology* 46(1-2), 115-25.
- 20 Huisman, W., Karlas, J.A., Siebelink, K.H., Huisman, R.C., de Ronde, A., Francis, M.J., Rimmelzwaan, G.F. and Osterhaus, A.D. (1998) Feline immunodeficiency virus subunit vaccines that induce virus neutralising antibodies but no protection against challenge infection. *Vaccine* 16(2-3), 181-7.
- 25 Idziorek T, Khalife J, Billaut-Mulot O, Hermann E, Aumercier M, Mouton Y, Capron A, Bahr GM (1998) Recombinant human IL-16 inhibits HIV-1 replication and protects against activation-induced cell death (AICD) *Clin Exp Immunol*;112(1):84-91
- Jarrett, O., Yamamoto, J.K. and Neil, J.C. (1990) Feline immunodeficiency virus as a model for AIDS vaccination. [Review] [15 refs]. *Aids* 4(Suppl 1), S163-5.
- 30 Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM (1995) CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation, *Nature* 374(6522):546-9.
- Leutenegger, C.M., Hofmann-Lehmann, R., Holznagel, E., Cuisinier, A.M., Wolfensberger, C., Duquesne, V., Cronier, J., Allenspach, K., Aubert, A., Ossent, P. and

- Lutz, H. (1998) Partial protection by vaccination with recombinant feline immunodeficiency virus surface glycoproteins. *AIDS Research & Human Retroviruses* 14(3), 275-83.
- 5 Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., Bauer-Pham, K., Holznagel, E., Tozzini, F., Bendinelli, M., Reubel, G., Aubert, A., Davis, D., Cox, D. and et al. (1995) FIV vaccine studies. I. Immune response to recombinant FIV env gene products and outcome after challenge infection. *Veterinary Immunology & Immunopathology* 46(1-2), 103-13.
- 10 Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., Leutenegger, C., Allenspach, K., Cuisinier, A.M., Cronier, J., Duquesne, V. and Aubert, A. (1996) Vaccination of cats with recombinant envelope glycoprotein of feline immunodeficiency virus: decreased viral load after challenge infection. [Review] [17 refs]. *AIDS Research & Human Retroviruses* 12(5), 431-3.
- 15 Lipford, G.B., Bauer, M., Blank, C., Reiter, R., Wagner, H. and Heeg, K. (1997) CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. *European Journal of Immunology* 27(9), 2340-4.
- Mackewicz CE, Barker E, Levy JA, (1996) Role of beta-chemokines in suppressing HIV replication. *Science*, 22;274(5291):1393-5
- 20 Morikawa, S., Lutz, H., Aubert, A. and Bishop, D.H. (1991) Identification of conserved and variable regions in the envelope glycoprotein sequences of two feline immunodeficiency viruses isolated in Zurich, Switzerland. *Virus Research* 21(1), 53-63.
- 25 Osterhaus, A.D., Tijhaar, E., Huisman, R.C., Huisman, W., Darby, I.H., Francis, M.J., Rimmelzwaan, G.F. and Siebelink, K.H. (1996) Accelerated viremia in cats vaccinated with recombinant vaccinia virus expressing envelope glycoprotein of feline immunodeficiency virus. *AIDS Research & Human Retroviruses* 12(5), 437-41.
- 30 Pedersen, N.C., Ho, E.W., Brown, M.L. and Yamamoto, J.K. (1987) Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science* 235(4790), 790-3.
- Richardson, J., Moraillon, A., Baud, S., Cuisinier, A.M., Sonigo, P. and Pancino, G. (1997) Enhancement of feline immunodeficiency virus (FIV) infection after DNA vaccination with the FIV envelope. *Journal of Virology* 71(12), 9640-9.
- 35 Richardson, J., Moraillon, A., Crespeau, F., Baud, S., Sonigo, P. and Pancino, G. (1998) Delayed infection after immunization with a peptide from the transmembrane glycoprotein of the feline immunodeficiency virus. *Journal of Virology* 72(3), 2406-15.

- Romagnani, S., Maggi, E. and Del Prete, G. (1994) An alternative view of the Th1/Th2 switch hypothesis in HIV infection. *AIDS Research & Human Retroviruses* 10(5), iii-ix.
- 5 Tonelli, Q.J. (1991) Enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus. [Review] [7 refs]. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 199(10), 1336-9.
- Torten, M., Franchini, M., Barlough, J.E., George, J.W., Mozes, E., Lutz, H. and Pedersen, N.C. (1991) Progressive immune dysfunction in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. *Journal of Virology* 65(5), 2225-30.
- 10 Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, De Witt CM, Friedman A et al. (1993) Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259: 1745-1749).
- 15 Yamamoto, J.K., Hohdatsu, T., Olmsted, R.A., Pu, R., Louie, H., Zochlinski, H.A., Acevedo, V., Johnson, H.M., Soulds, G.A. and Gardner, M.B. (1993) Experimental vaccine protection against homologous and heterologous strains of feline immunodeficiency virus. *Journal of Virology* 67(1), 601-5.
- Yamamoto, J.K., Okuda, T., Ackley, C.D., Louie, H., Pembroke, E., Zochlinski, H., Munn, R.J. and Gardner, M.B. (1991) Experimental vaccine protection against feline immunodeficiency virus. *AIDS Research & Human Retroviruses* 7(11), 911-22.
- 20 Zhou P, Goldstein S, Devadas K, Tewari D, Notkins AL, (1997) Human CD4+ cells transfected with IL-16 cDNA are resistant to HIV-1 infection: inhibition of mRNA expression. *Nat Med* 3(6):659-64.

Patentansprüche

1. Vakzine zur Schutzimpfung oder Therapie einer Lentiviren-Infektion bei Feliden, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine immunisierende Polynukleotidsequenz enthält, die mindestens ein Teil des Gens eines Proteins, insbesondere des Hüllproteins (env-Gen), des entsprechenden Lentivirus, unter der Kontrolle eines in dem entsprechenden Tier operablen eukaryonten Promoters enthält oder daraus besteht.
2. Vakzine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Lentivirus ein Lentivirus eines Tiers der Gattung der Feliden, insbesondere einer Hauskatze ist.
3. Vakzine nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Lentivirus das feline Immunschwäche-Virus (FIV) ist.
4. Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die immunisierende Polynukleotidsequenz eine kodierende Sequenz enthält, welche die extraviral oder extrazellulär gelegene Domäne des env-Genprodukts oder einen Teil davon enthält oder daraus besteht.
5. Vakzine nach einem der Ansprüche 4, dadurch gekennzeichnet, dass die immunisierende Polynukleotidsequenz eine kodierende Sequenz für mindestens zwanzig Aminosäuren des Transmembrananteils des env-Genprodukts enthält oder daraus besteht.
6. Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich mindestens einen immunisierenden Teil eines Innenproteins des Lentivirus, beispielsweise des gag-Gens enthält.
7. Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die immunisierende Polynukleotidsequenz die kodierende Sequenz (SEQ ID

5 NO. 4) der unter SEQ ID NO 1 angegebenen Plasmidsequenz oder eine mit der kodierenden Sequenz (SEQ ID NO 4) der unter SEQ ID NO 1 angegebenen Plasmidsequenz zu 85 % identische Sequenz, oder eine kodierende Sequenz, die ohne die Entartung des genetischen Codes mit der kodierenden Sequenz der unter SEQ ID NO 1 angegebenen Sequenz zu mindestens 85 % identisch ist, enthält.

10 8. Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Hilfs-Polynukleotidsequenz enthält, welche die für IL-12 codierenden Sequenzen unter der Kontrolle eines oder mehrerer im entsprechenden Tier operablen eukaryonten Promoter enthält.

9. Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Hilfs-Polynukleotidsequenz enthält, welche die für IL-16 codierende Sequenz unter der Kontrolle eines im entsprechenden Tier operablen eukaryonten Promoters enthält.

15 10. Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Hilfs-Polynukleotidsequenz enthält, welche die für IL-12 und IL-16 codierenden Sequenzen unter der Kontrolle eines oder mehrerer im entsprechenden Tier operablen eukaryonten Promoter enthält.

20 11. Vakzine nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Hilfs-Polynukleotidsequenz eine Sequenz enthält, die für beide Untereinheiten des feline IL-12 und/oder für das feline IL-16 codiert und dass diese Sequenzen unter der Kontrolle eines in Katzen operablen eukaryoten Promoters sind.

25 12. Vakzine nach einem der Ansprüche 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Hilfs-Polynukleotidsequenz enthält, welche mindestens eine Sequenz der Basenfolge $N^1N^2CGN^3N^4$ aufweist, wobei N^1N^2 ein Element aus der Gruppe GT, GG, GA, AT oder AA und N^3N^4 ein Element aus der Gruppe CT oder TT ist.

13. Vakzine nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die immunisierenden Polynukleotidsequenz n und oder die Hilfs-Polynukleotidsequenzen als Expressionskonstrukte vorliegen, die aus kovalent geschlossenen linearen Desoxyribonukleinsäuremolekülen bestehen, welche einen linearen Doppelstrangbereich aufweisen und welche doppelstrangbildenden Einzelstränge durch kurze einzelsträngige Schleifen aus Desoxyribonukleinsäurenukleotiden verknüpft sind, und welche Doppelstrangbildenden Einzelstränge nur aus der kodierenden Sequenz unter Kontrolle eines im zu impfenden Tier operablen Promotors und einer Terminatorsequenz besteht.
14. Vakzine gemäss einem der Ansprüche 8 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Hilfs-Polynukleotidsequenz eine kodierende Sequenz gemäss SEQ ID NO 8 (IL-12 p40), eine kodierende Sequenz gemäss SEQ ID NO 9 (IL-12 p35), eine kodierende Sequenz SEQ ID NO 10 (IL-16), SEQ ID NO 5 (CpG) oder SEQ ID NO 6 (CpG) oder eine zu einer dieser Sequenzen komplementäre Sequenz enthält.
15. Vakzine gemäss einem der Ansprüche 1 bis 14 zur Impfung oder Therapie einer Lentivirusinfektion bei Tieren, dadurch gekennzeichnet, dass eine immunisierende Polynukleotidsequenz und gegebenenfalls eine Hilfs-Polynukleotidsequenz gemäss einem der Ansprüche 8 bis 12 auf einem geeigneten massereichen und inerten Trägermaterial aufgebracht vorliegt, derart, dass sie auf die Haut des Tieres beschleunigt, in die Zellen der Haut des Tieres eindringen und dort exprimiert werden kann.
16. Vakzine gemäss Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Tier zur Gattung der Feliden gehört und vorzugsweise eine Hauskatze ist.
17. Vakzine gemäss Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Trägermaterial Gold ist.
18. Vakzine zur Schutzimpfung oder Therapie einer Lentivirus-Infektion bei Feli- den, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein immunisierendes Protein oder inen immunisierenden T il ein s Proteins, insbesondere d s Hüllproteins

des entsprechenden Lentivirus zusammen mit IL-12 und/oder IL-16 je als Protein enthält.

- 5 19. Verfahren zur Herstellung eines immunisierenden Lentivirus-Protein oder von immunisierenden Teilen davon, insbesondere von Proteinen oder Teilen von Proteinen des FIV, dadurch gekennzeichnet, dass eine entsprechende Nukleotidsequenz unter der Kontrolle geeigneter Expressionssequenzen in einer Wirtszelle exprimiert und daraus isoliert wird.

<110> Mologen Forschungs-, Entwicklungs- und Vertriebs G
Universität Zürich

<120> Impfstoff gegen Infektionen mit Lentiviren, wie dem
felines Immunschwäche-Virus der Katze

<130> XI 1057/00

<140>

<141>

<150> CH 1999 1258/99

<151> 1999-07-08

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 5871

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: FIV gp140
(pMOLFIVgp140)

<400> 1

```
tcttccgctt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggtcg ttcggctgcg gcgagcggta 60
tcagctcact caaaggcggg aatacgggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag 120
aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg 180
ttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg 240
tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg 300
cgctctctcg ttcggacctt gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga 360
agcgtggcgc tttctcatag ctcacgctgt aggtatctca gttcgggtgta ggtcgttcgc 420
tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggg 480
aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaga cagacttat cgccactggc agcagccact 540
ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcgggtgta cagagttctt gaagtgggtg 600
cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt 660
accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg 720
gggttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct 780
ttgatctttt ctacgggggc tgacgctcag tggaacgaaa actcacgtta agggattttg 840
gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt 900
aatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggctgaca gttaccaatg cttaatcagt 960
gaggcaccta tctcagcgat ctgtctatct cggtcatcca tagttgcctg actccccgtc 1020
gtgtagataa ctacgatacg ggaggggctta ccatctggcc ccagtgcctgc aatgataaccg 1080
```

THIS PAGE BLANK (USPTO)

cgagacccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc 1140
 gagcgagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg 1200
 gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttggtgc cattgctaca 1260
 ggcacgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga 1320
 tcaaggcgag ttacatgatc ccccatggtg tgcaaaaaag cggttagctc ctccggtcct 1380
 ccgatcggtg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatgggtat ggcagcactg 1440
 cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca 1500
 accaagtcac tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata 1560
 cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct 1620
 tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaacccact 1680
 cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa 1740
 acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga cacggaaatg ttgaatactc 1800
 atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga 1860
 tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga 1920
 aaagtgccac ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga cattaacctt taaaaatagg 1980
 cgtatcacga ggccctttcg tctcgcgcgt ttccggtgatg acggtgaaaa cctctgacac 2040
 atgcagctcc cggagacggt cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc 2100
 cgtcagggcg cgtcagcggg tgttggcggg tgtcggggct ggcttaacta tgcggcatca 2160
 gagcagattg tactgagagt gcaccatatg cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg 2220
 agaaaatacc gcatcaggcg ccattcgcca ttcaggctgc gcaactgttg ggaagggcga 2280
 tcggtgcccc cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag ggggatgtgc tgcaaggcga 2340
 ttaagttggg taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt gtaaaacgac ggccagtgcc 2400
 aagcttgcca attctggatc cgctagctta accgtattac cgccatgcat tagttattaa 2460
 tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa 2520
 cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc ccgcccatt gacgtcaata 2580
 atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag 2640
 tattttacgg aaactgcccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc 2700
 cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta catgacctta 2760
 tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg 2820
 cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt 2880
 ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca 2940
 aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatggcg gtaggcgtgt acggtgggag 3000
 gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cgtcagatgg taccatggca gaaggatttg 3060
 cagccaatag acaatggata gggccagaag aagctgaagg gttgttagat tttgatatag 3120
 caacacaaat gaatgaagaa gggccactaa atccaggaat aaaccattt aggggtgcctg 3180
 gaatagcaga aatagaaaag cgagactatt gcaaaatatt acaaccctaa ttacaagatc 3240
 taaagaatga aattcaagag gtaaaaactg agaaggaag tgcaggtgaa tttagaagag 3300
 caagattttt aagatattct gatgaaaata tattatccct gattcatttg ttcatagggg 3360
 attgtacata tttatgcaga aaaaatgagt taggatcttt acgacatgac atagatatag 3420
 acgaacatca agaagagtat tatactagta tagagaaagg tacaactgcc aatataaaat 3480
 atggtagacg atgtctcata ggaacagcgg ctttgtacct gcttttcata ggaataataa 3540
 tatatacaca aacaaccaag gctcaggtag tatggagact tccaccatta gtagtccccg 3600
 tgaaagaatc agagataatt ttttgggatt gtgggcacc agaggaacc gcctgtcagg 3660
 actttcttgg ggcaatgata catctaaaag ctagtacaaa tataagtata caagagggac 3720
 ctaccctggg gaattgggct agagaaatat ggggaacatt attcaaaaag gctaccagac 3780
 aatgtagaag aggtagagta tggagaagat ggaatgagac tataacagga ccatcaggat 3840
 gtgctaataa cacatgttat aatatctcag taatagtacc tgattatcaa tgttatttag 3900
 acagagtaga tacttggtta caagggaag taaatatatc attatgtcta acaggaggaa 3960

THIS PAGE BLANK (USPTO)


```

aaatgttgta taataaatat acaaaacaat tgagctattg tacagatcca ttacaaatcc 4020
cactgatcaa ttatacgttt ggacctaatac aaacatgtaa gtggaacact tcacagattc 4080
aagactctga gataccaaaa tgtggatggg ggaatcaagc agcctattat aacagttgta 4140
gatgggaaaag cactgatgta aagtttcatt gtcaaagaac acagagtctg cctggaacat 4200
ggcttagaac aatctcatca tggaggccaa agaatagatg ggaatggagg ccagattttg 4260
aaagtgaaaa agtgaaagta tctctacagt gtaatagcac aagcaaccta acctttgcaa 4320
tgagaagttc aggagattat ggagaggtaa cgggagcatg gatagaattt ggatgtcata 4380
ggaaaaaatc aaaacttcat tctgaagcaa ggtttagaat cagatgtaga tgggataaag 4440
gggataatac ctactcatt gatacatgtg gaaaaactca aaatgtttta ggtgcaaatac 4500
ctgtagattg caccatgtat gcaaatagaa tgtataattg ttccttacia aatgggttta 4560
ctatgaagat agatgacctt gttatgcatt tcaatatgac gaaagctgta gaaatgtata 4620
acattgctgg aaattgggtct tgtacatctg acttgccacc aacatggggg tatatgaatt 4680
gtaattgtac aaatagtagt agtacaacta gtagttctgg taataaaatg gcatgtcctg 4740
gagataaagg tatcttaaga aattgggata acccagtagc aggattaaga caatccctag 4800
aaaagtatca agtagtaaaa caaccagatt acttagtggt gccaggggaa gtcattggaat 4860
ataaacctag aaggaaaaga gcagctattc atgttatgtt agctcttgca acagtattat 4920
ctatggccgg ggcagggacg ggggctactg ctatagggat ggtaacgcaa tatcaccaag 4980
ttctggcaac tcatcaagaa gctatagaaa aggtgactga agccttaaag ataaacaact 5040
taagattagt tacattagag catcaagtac tagtaatagg attaaaagta gaagctatgg 5100
aaaaattttt atatacagct ttcgctatgc aagaattagg atgtaatcaa aatcaattct 5160
tctgtaaagt ccctcctgtg ttgtgggaaa gatataatat gactataaat caaacaatat 5220
ggaatcatgg aaatataact ttgggggaat ggtataacca aacaaaagat ttacaacaaa 5280
agttctatga aataataatg gacatagaac aaaataatgt acaaggaaaa aaagggttac 5340
aacaattaca aaaatgggaa gattgggtag gatggatagg aaatattcca aaatatttat 5400
aagagctcat aatcagccat accacatttg tagaggtttt acttgcttta aaaaacctcc 5460
cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa tgaatgcaat tcttggtgtt aacttgttta 5520
ttgcagctta taatgggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca aataaagcat 5580
ttttttcact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct taacgcgaat 5640
tcgtaatcat ggtcatagct gtttcctgtg tgaaattggt atccgctcac aattccacac 5700
aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggt cctaattgagt gagctaactc 5760
acattaattg cgttgcgctc actgcccgct ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg 5820
cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggag c 5871

```

<210> 2

<211> 4522

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: IL-12p40

<400> 2

```

tcttccgctt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggtcg ttcggctgag gcgagcggtg 60
tcagctcact caaaggcggg aatacgggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaaag 120
aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg 180
tttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaata atcgacgctc aagtcagagg 240
tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcggttc cccctggaag ctccctcggt 300

```

THIS PAGE BLANK (USPTO)

cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga 360
 agcgtggcgc tttctcatag ctcacgctgt aggtatctca gttcgggtga ggctcgttcgc 420
 tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gccagcccc accgctgcgc cttatccggt 480
 aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaaga cagcacttat cgccactggc agcagccact 540
 ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcgggtgcta cagagttctt gaagtgggtg 600
 cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt 660
 accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg 720
 gggttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct 780
 ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaaacgaaa actcacgtta agggattttg 840
 gtcattgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt 900
 aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggctcgaca gttaccaatg cttaatcagt 960
 gaggcaccta tctcagcgat ctgtctatct cgttcatcca tagttgcctg actccccgtc 1020
 gtgtagataa ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc ccagtgcctg aatgataccg 1080
 cgagaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc 1140
 gagcgcagaa gtggctcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg 1200
 gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttggtgc cattgctaca 1260
 ggcatcgtgg tgtcacgctc gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga 1320
 tcaaggcgag ttacatgac ccccatggtg tgcaaaaaag cggtagctc cttcggctct 1380
 ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatgggtat ggagcactg 1440
 cataattctc ttaactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca 1500
 accaagtcatt tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata 1560
 cgggataata ccgcgccaca tagcagaact taaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct 1620
 tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact 1680
 cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa 1740
 acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca cacggaaatg ttgaatactc 1800
 atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga 1860
 tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga 1920
 aaagtgccac ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga cattaaccta taaaaatagg 1980
 cgtatcacga ggccctttcg tctcgcgcgt ttcgggtgat acggtgaaaa cctctgacac 2040
 atgcagctcc cggagacggg cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc 2100
 cgtcagggcg cgtcagcggg tgttgccggg tgctcggggc ggcttaacta tgcggcatca 2160
 gagcagattg tactgagagt gcaccatatg cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg 2220
 agaaaatacc gcatcaggcg ccattcgcca ttcaggctgc gcaactgttg ggaagggcga 2280
 tcgggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaa ggggatgtgc tgcaaggcga 2340
 ttaagttggg taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt gtaaaacgac ggccagtgc 2400
 aagcttggtc tccccctgga tccgctagct taaccgtatt accgccatgc attagttatt 2460
 aatagtaatc aattacgggg tcattagtct atagcccata tatggagttc cgcgttacat 2520
 aacttacggg aaatggccc cctggctgac cgcccaacga ccccgccca ttgacgtcaa 2580
 taatgacgta tgttcccata gtaacgcca tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg 2640
 agtatttacg gtaaaactgc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc 2700
 cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgccag tacatgacct 2760
 tatgggactt tctacttg cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatgggtga 2820
 tgcggttttg gcagtacatc aatgggcgtg gatagcgggt tgactcacgg ggatttccaa 2880
 gtctccaccc cattgacgtc aatgggagtt tgttttgcca ccaaaatcaa cgggactttc 2940
 caaaatgtcg taacaactcc gcccattga cgcaaatggg cggtaggcgt gtacgggtgg 3000
 aggtctatat aagcagagct ggtttagtga accgtcagat ggtacatgc atcctcagca 3060
 gttggctcat gcctgggttt cctgggttt gctggcacct cccctcatgg ccatatggga 3120
 actggagaaa aacgtttatg ttgtagagtt ggactggcac cctgatgccc ccggagaaat 3180

THIS PAGE BLANK (USPTO)

```

ggtggtcctt acctgcaata ctctgaaga agatgacatc acctggacct ctgaccagag 3240
cagtgaagtc ctaggctctg gtaaaactct gaccatccaa gtcaaagaat ttgcagatgc 3300
tggccagtat acctgtcata aaggaggcga ggttctgagc cattcgttcc tctgataca 3360
caaaaaggaa gatggaattt ggtccactga tatcttaagg gaacagaaag aatccaaaaa 3420
taagatcttt ctaaaatgtg aggcaaagaa ttattctgga cgtttcacct gctgggtggct 3480
gacggcaatc agtaccgatt tgaaattcac tgtcaaaagc agcagaggct cctctgaccc 3540
ccaaggggtg acttgtggag cagcgacact ctacagagag aaggtcagag tggacaacag 3600
ggattataag aagtacacag tggagtgtca ggagggcagt gcctgcccgg ctgccgagga 3660
gagcctaccc attgaagtgc tgggtggacgc tattcacaag ctcaagtacg aaaactacac 3720
cagcagcttc ttcacagagg acatcatcaa accggaccca cccaagaacc tgcaactgaa 3780
gccattaaaa aattctcggc atgtggaagt gagctgggaa taccctgaca cctggagcac 3840
cccacattcc tacttctcct taacatttgg cgtacaggtc cagggaaga acaacagaga 3900
aaagaaagac agactctccg tggacaagac ctacagccaag gtcgtgtgcc acaaggatgc 3960
caagatccgc gtgcaagcca gggaccgcta ctatagctca tcctggagca actgggcac 4020
cgtgtcctgc agttaggagc tcataatcag ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc 4080
tttaaaaaac ctcccacacc tcccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg caattcttgt 4140
tggttaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt 4200
cacaaataaa gcattttttt cactgcattc tagttgtggg ttgtccaaac tcatcaatgt 4260
atcttaacgc gaattcaggg ggagaccaa ttcgtaatca tggatcatag tgtttcctgt 4320
gtgaaattgt tatccgctca caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa 4380
agcctggggg gcctaattgag tgagctaact cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc 4440
tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcgccaac gcgcggggag 4500
aggcggtttg cgtattgggc gc
4522

```

<210> 3

<211> 4201

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: IL-12p35

(pMOLfIL-12p35 (e-,_e31-)clone61)

<400> 3

```

tcttccgctt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggctg ttcggctgcg gcgagcggta 60
tcagctcact caaaggcggg aatacgggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag 120
aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg 180
tttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg 240
tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc ccctggaag ctccctcgctg 300
cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga 360
agcgtggcgc tttctcatag ctacgctgt aggtatctca gttcgggtgta ggtcgttcgc 420
tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccc accgctgcgc cttatccggg 480
aactatcgtc ttgagtccaa cccggtgaaga cacgacttat cgccactggc agcagccact 540
ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcgggtgcta cagagttctt gaagtgggtg 600
cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggatatct gcgctctgct gaagccaggt 660
accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg 720
ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct 780

```

THIS PAGE BLANK (USPTO)

```

ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaaacgaaa actcacgtta agggattttg 840
gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt 900
aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggcttgaca gttaccaatg cttaatcagt 960
gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt cgttcatcca tagttgcctg actccccgtc 1020
gtgtagataa ctacgatacg ggagggtcta ccatctggcc ccagtgcctgc aatgataccg 1080
cgagaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc 1140
gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg 1200
gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttggtgc cattgctaca 1260
ggcatcgtgg tgtcacgctc gtcgttttgt atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga 1320
tcaaggcgag ttacatgac ccccatgttg tgcaaaaaag cggtagctc cttcggtcct 1380
ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg 1440
cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca 1500
accaagtcac tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata 1560
cgggataata ccgcccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct 1620
tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact 1680
cgtgcacca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa 1740
acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca cacggaaatg ttgaatactc 1800
atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga 1860
tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga 1920
aaagtgccac ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga cattaaccta taaaaatagg 1980
cgtatcacga ggccctttcg tctcgcgctg ttcggtgatg acggtgaaaa cctctgacac 2040
atgcagctcc cggagacggg cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc 2100
cgtcagggcg cgtcagcggg tgttggcggg tgtcggggct ggcttaacta tgcggcatca 2160
gagcagattg tactgagagt gcaccatatg cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg 2220
agaaaatacc gcatcaggcg ccattcgcca ttcaggctgc gcaactgttg ggaagggcga 2280
tcggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag ggggatgtgc tgcaaggcga 2340
ttaagttggg taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt gtaaaacgac ggccagtgcc 2400
aagcttggtc tccccctgga tccgctagct taaccgtatt accgccatgc attagttatt 2460
aatagtaatc aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc cgcgttacat 2520
aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga ccccgccca ttgacgtcaa 2580
taatgacgta tgttcccata gtaacgccaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg 2640
agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc 2700
cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgccag tacatgacct 2760
tatgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgtatt accatggtga 2820
tgcggttttg gcagtacatc aatgggcgtg gatagcgggt tgactcacgg ggatttccaa 2880
gtctccacce cattgacgtc aatgggagtt tgttttgga ccaaaatcaa cgggactttc 2940
caaaatgtcg taacaactcc gcccattga cgcaaaggg cggtaggcgt gtacggtggg 3000
aggtctatat aagcagagct ggtttagtga accgtcagat ggtaccatgt gccgcgcgcg 3060
tggcctcctc cttgtaacca tctggtcct gttaaaccac ctggaccacc tcagtttggc 3120
caggaacctc cccacacca caccaagccc aggaatgttc cagtgcctca accactccca 3180
aacctgctg cgagccatca gcaacacgct tcagaaggcc agacaaactc tagaatttta 3240
cccctgcact tccgaagaga ttgatcatga agatatcaca aaagataaaa ccagcacagt 3300
ggaggcctgc ttaccactgg aattagccat gaatgagagt tgcctggctt ccagagagat 3360
ctctctgata actaatggga gttgcctggg gtccagaaag acctctttta tgacgacct 3420
gtgccttagc agtatctatg aggacttgaa gatgtaccag gtggagtcca aggccatgaa 3480
tgcaaagctg ttaatggatc ctaaaaggca gatctttctg gatcaaaaca tgctgacagc 3540
tattgatgag ctgatgcagg ccctgaattt caacagtgtg actgtgccac agaactcctc 3600
ccttgaagaa ccggtttttt ataaaactaa aatcaagctc tgcatacttc ttcagtcttt 3660

```

THIS PAGE BLANK (USPTO)

cagaatccgt gcagtgacca tcaatagaat gatgagctat ctgaatgctt cctaggagct 3720
 cataatcagc cataccacat ttgtagaggt tttacttgct ttaaaaaacc tcccacacct 3780
 cccctgaac ctgaaacata aatgaatgc aattgttggt gttaacttgt ttattgcagc 3840
 ttataatggg taaaaataaa gcaatagcat cacaaatttc acaataaaag cttttttttc 3900
 actgcattct agttgtgggt tgtccaaact catcaatgta tcttaacgcg aattcagggg 3960
 gagaccaat tcgtaatcat ggtcatagct gtttcctgtg tgaaattgtt atccgctcac 4020
 aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg cctaattgagt 4080
 gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgtt ttccagtcgg gaaacctgtc 4140
 gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggag 4200
 c 4201

<210> 4

<211> 3903

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: IL-16

<400> 4

tcttcgctt cctcgctcac tgaactgctg cgtcgggtcg ttcggctgag gcgagcggtg 60
 tcagctcact caaaggcggg aatacgggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaaag 120
 aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg 180
 tttttccata ggctcggccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg 240
 tggcgaaaacc cgacaggact ataaagatac caggcggttc cccctggaag ctccctcgtg 300
 cgctctcctg ttccgacctt gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga 360
 agcgtggcgc tttctcatag ctacgctgtt aggtatctca gttcggtgta ggtcgttcgc 420
 tccaagctgg gctgtgtgca cgaacccccg gttcagcccg accgctgagc cttatccggg 480
 aactatcgctc ttgagtccaa cccggtgaaga cagcacttat cggcactggc agcagccact 540
 ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtgggtg 600
 cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt 660
 accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg 720
 gggttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct 780
 ttgatctttt ctacgggggc tgacgctcag tggaacgaaa actcacgtta agggattttg 840
 gtcattgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt 900
 aaatcaatct aaagtatata tgagtaaaact tggcttgaca gttaccaatg cttaatcagt 960
 gaggcaccta tctcagcgat ctgtctatct cgttcattca tagttgcctg actccccgtc 1020
 gtgtagataa ctacgatacg ggagggttta ccatctggcc ccagtgtgctc aatgataccg 1080
 cgagaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaaggggc 1140
 gagcgagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg 1200
 gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttggtgc cattgctaca 1260
 ggcattcgtg tgctacgctc gtcgtttggg atgggttcat tcagctccgg ttcccaacga 1320
 tcaaggcgag ttacatgac ccccatgttg tgcaaaaaag cgggttagctc cttcggctct 1380
 ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg 1440
 cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca 1500
 accaagtcatt tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata 1560
 cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct 1620

THIS PAGE BLANK (USPTO)

```

tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaacccact 1680
cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttcttg gtgagcaaaa 1740
acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca cacggaaatg ttgaatactc 1800
atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga 1860
tacatatattg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga 1920
aaagtgccac ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga cattaaccta taaaaatagg 1980
cgtatcacga ggccttttcg tctcgcgctt ttcggtgatg acggtgaaaa cctctgacac 2040
atgcagctcc cgagacgggt cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc 2100
cgtcagggcg cgtcagcggg tggtggcggg tgtcggggct ggcttaacta tgcggcatca 2160
gagcagattg tactgagagt gcaccatatg cgggtgtgaa taccgcacag atgcgtaagg 2220
agaaaaatac gcatcaggcg ccattcgcca ttcaggctgc gcaactgttg ggaagggcga 2280
tcggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag ggggatgtgc tgcaaggcga 2340
ttaagtggg taacgccagg gttttccag tcacgacgtt gtaaacgac ggccagtgcc 2400
aagcttgcca attctggatc cgctagctta accgtattac cgccatgcat tagttattaa 2460
tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa 2520
cttacggtaa atggcccgcc tggtgaccg cccaacgacc ccgcccatt gacgtcaata 2580
atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag 2640
tatttacggt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgcc 2700
cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta catgacctta 2760
tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg 2820
cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacggg atttccaagt 2880
ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca 2940
aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatggcg gtaggcgtgt acggtgggag 3000
gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cgtcagatgg taccatgcc gacctcaact 3060
cctccactga ttctacaaac tcggcttctg tggccagcga cgtttctggg gattccacgg 3120
aggccacggt gcacacggtg acgctggaga agacgtccgc ggggctgggc ttcagcctgg 3180
aaggcggcaa gggctccctg ctcggggaca agcctctcac cgtgaacagg attttcaaag 3240
gggcagcctc ggaacagagc gagacgatcc agccgggaga tgaaatctta cacttggccg 3300
gcactgccgt gcaggggctc acgcggtttg aagcctggaa cgttatcaag acgttgccctg 3360
acggccccgt cacgatcgtc atcaggagga gaagcgtcca gtcctcgga accacagctg 3420
ctggagactc ctaggagctc ataatcagcc ataccacatt ttagaggtt ttacttgctt 3480
taaaaaacct cccacacctc cccctgaacc tgaaacataa aatgaatgca attcttggtg 3540
ttaacttggt tattgcagct tataatgggt acaaataaag caatagcatc acaaatttca 3600
caaataaagc atttttttca ctgcattcta gttgtggttt gtccaaactc atcaatgtat 3660
cttaacgcga attcgtaatc atggctatag ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc 3720
acaattccac acaacatacg agccggaagc ataaagtgt aagcctggg tgctaatga 3780
gtgagctaac tcacattaat tgcgttgccg tcaactgccg ctttccagtc gggaaacctg 3840
tcgtgccagc tgcattaatg aatcgcccaa cgcgcgggga gaggcggtt gcgtattggg 3900
cgc
3903

```

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: CpG

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 5

gttcttcggg gcgttctttt ttaagaacgc ccc

33

<210> 6

<211> 35

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: CpG

<400> 6

gaagaacggtt ttccaatgat ttttcattgg aaaac

35

<210> 7

<211> 2358

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequence
coding for SEQ ID NO 1, FIV env gene

<400> 7

atggcagaag gatttgcagc caatagacaa tggatagggc cagaagaagc tgaagggttg 60
 ttagattttg atatagcaac acaaatgaat gaagaagggc cactaaatcc aggaataaac 120
 ccatttaggg tgcctggaat agcagaaata gaaaagcgag actattgcaa aatattacaa 180
 cccaaattac aagatctaaa gaatgaaatt caagaggtaa aactggaaga aggaaatgca 240
 ggtaagttta gaagagcaag atttttaaga tattctgatg aaaatatatt atccctgatt 300
 catttgttca tagggatttg tacatattta tgcagaaaaa atgagttagg atctttacga 360
 catgacatag atatagacga acatcaagaa gagtattata ctagtataga gaaagggtaca 420
 actgccaaata taaaatatgg tagacgatgt ctcataggaa cagcggcctt gtacctgctt 480
 ttcataggaa taataatata tacacaaaca accaaggctc aggtagtatg gagacttcca 540
 ccattagtag tccccgtgaa agaatcagag ataatttttt gggattgttg ggcaccagag 600
 gaacccgcct gtcaggactt tcttggggca atgatacatc taaaagctag taaaaatata 660
 agtatacaag agggacctac cctggggaat tgggctagag aaatatgggg aacattattc 720
 aaaaaggcta ccagacaatg tagaagaggt agagtatgga gaagatggaa tgagactata 780
 acaggaccat caggatgtgc taataacaca tggtataata tctcagtaat agtacctgat 840
 tatcaatggt atttagacag agtagatact tgggtacaag ggaaagtaaa tatatcatta 900
 tgtctaacag gaggaaaaat gttgtataat aaatatacaa aacaattgag ctattgtaca 960
 gatccattac aaatcccact gatcaattat acgtttggac ctaatcaaac atgtaagtgg 1020
 aacacttcac agattcaaga ctctgagata ccaaatgtg gatgggtggaa tcaagcagcc 1080
 tattataaca gttgtagatg ggaaagcact gatgtaaagt ttcattgtca aagaacacag 1140
 agtctgcctg gaacatggct tagaacaatc tcatcatgga ggccaaagaa tagatgggaa 1200
 tggaggccag attttgaaag tgaaaaagtg aaagtatctc tacagtgtaa tagcacaagc 1260

THIS PAGE BLANK (USPTO)

```

aacctaacct ttgcaatgag aagttcagga gattatggag aggtaacggg agcatggata 1320
gaatttggat gtcataaggaa aaaatcaaaa cttcattctg aagcaagggt tagaatcaga 1380
tgtagatggg ataaaggggg taatacctca ctcattgata catgtggaaa aactcaaaat 1440
gttttaggtg caaatcctgt agattgcacc atgtatgcaa atagaatgta taattgttcc 1500
ttacaaaatg gggttactat gaagatagat gaccttgta tgcatttcaa tatgacgaaa 1560
gctgtagaaa tgtataacat tgctggaaat tggctctgta catctgactt gccaccaaca 1620
tgggggtata tgaattgtaa ttgtacaaat agtagtagta caactagtag ttctggtaat 1680
aaaatggcat gtcctggaga taaaggatc ttaagaaatt ggtataaccc agtagcagga 1740
ttaagacaat ccctagaaaa gtatcaagta gtaaaacaac cagattactt agtggtgcca 1800
ggggaagtca tggaatataa acctagaagg aaaagagcag ctattcatgt tatgttagct 1860
cttgcaacag tattatctat ggccggggca gggacggggg ctactgctat agggatggta 1920
acgcaatatt accaagttct ggcaactcat caagaagcta tagaaaagg gactgaagcc 1980
ttaagataa acaacttaag attagttaca ttagagcatc aagtactagt aataggatta 2040
aaagtagaag ctatggaaaa atttttatat acagctttcg ctatgcaaga attaggatgt 2100
aatcaaaatc aattcttctg taaagtcct cctgtgttgt gggaaagata taatatgact 2160
ataaatcaaa caatatggaa tcatggaaat ataactttg gggatggta taaccaaaca 2220
aaagatttac aacaaaagtt ctatgaaata ataatggaca tagaacaaaa taatgtacaa 2280
ggaaaaaaag gggtacaaca attacaaaaa tgggaagatt gggtaggatg gataggaaat 2340
attccaaaat atttataa 2358

```

<210> 8

<211> 990

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequence
coding for SEQ ID NO 2, IL-12 p40

<400> 8

```

atgcacctc agcagttggt catcgctgg ttttcctgg ttttgcagg acctcccctc 60
atggccatat gggaaactgga gaaaaacgtt tatgtttag agttggactg gcaccctgat 120
gcccccgag aatgggtggt ccttacctgc aatactcctg aagaagatga catcacctgg 180
acctctgacc agagcagtga agtcctaggc tctggtaaaa ctctgaccat ccaagtcaaa 240
gaatttgcag atgctggcca gtatacctgt cataaaggag gcgaggttct gagccattcg 300
ttcctcctga tacacaaaaa ggaagatgga atttggtcca ctgatattt aagggaacag 360
aaagaatcca aaaataagat ctttctaaaa tgtgaggcaa agaattattc tggacgtttc 420
acctgctggt ggctgacggc aatcagtacc gatttgaaat tcaactgtcaa aagcagcaga 480
ggctcctctg acccccaagg ggtgacttgt ggagcagcga cactctcagc agagaaggtc 540
agagtggaca acagggatta taagaagtac acagtggagt gtcaggaggg cagtgcctgc 600
ccggtgccg aggagagcct acccattgaa gtcgtggtgg acgctattca caagctcaag 660
tacgaaaact acaccagcag cttcttcac agggacatca tcaaaccgga cccacccaag 720
aacctgcaac tgaagccatt aaaaaattct cggcatgtgg aagtgaagct ggaataccct 780
gacacctgga gcacccaca ttcctacttc tccttaacat ttggcgtaga ggtccagggc 840
aagaacaaca gagaaaagaa agacagactc tccgtggaca agacctcagc caaggtcgtg 900
tgccacaagg atgccaagat ccgctgcaa gccagggacc gctactatag ctcactctgg 960
agcaactggg catcctgtgc ctgcagttag 990

```

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 9

<211> 669

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequence
coding for SEQ ID NO 3, IL-12 p35

<400> 9

```

atgtgccccgc cgcgtggcct cctccttgta accatcctgg tcctgttaaa ccacctggac 60
cacctcagtt tggccaggaa cctccccaca cccacaccaa gcccaggaat gttccagtgc 120
ctcaaccact cccaaaccct gctgcgagcc atcagcaaca cgcttcagaa ggccagacaa 180
actctagaat tttacccttg cacttccgaa gagattgatc atgaagatat cacaaaagat 240
aaaaccagca cagtggaggc ctgcttacca ctggaattag ccatgaatga gagttgcctg 300
gcttccagag agatctctct gataactaat gggagttgcc tgggtgtccag aaagacctct 360
tttatgacga ccctgtgcct tagcagtatc tatgaggact tgaagatgta ccagggtggag 420
ttcaaggcca tgaatgcaaa gctgttaatg gatcctaaaa ggcagatctt tctggatcaa 480
aacatgctga cagctattga tgagctgatg caggccctga atttcaacag tgtgactgtg 540
ccacagaact cctcccttga agaaccggat ttttataaaa ctaaaatcaa gctctgcata 600
cttcttcatg ctttcagaat ccgtgcagtg accatcaata gaatgatgag ctatctgaat 660
gcttcctag                                     669

```

<210> 10

<211> 390

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequence
coding for SEQ ID NO 4, IL-16

<400> 10

```

atgcccgacc tcaactcctc cactgattct acaaactcgg cttctgtggc cagcgacgtt 60
tctggggatt ccacggaggc cacggtgcac acggtgacgc tggagaagac gtccgcgggg 120
ctgggcttca gcctggaagg cggcaagggc tccctgctcg gggacaagcc tctcaccgtg 180
aacaggatth tcaaaggggc agcctcggaa cagagcgaga cgatccagcc gggagatgaa 240
atcttacact tggccggcac tgccgtgcag gggctcacgc ggtttgaagc ctggaacgtt 300
atcaagacgt tgcctgacgg ccccgtcacg atcgatcatc ggaggagaag cgtccagtcc 360
tcgggaacca cagctgctgg agactcctag                                     390

```

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

10/030500

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference XI 1057/00	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE00/02262	International filing date (day/month/year) 08 July 2000 (08.07.00)	Priority date (day/month/year) 08 July 1999 (08.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N15/00		
Applicant MOLOGEN FORSCHUNGS-, ENTWICKLUNGS- UND VERTRIEBS GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet. <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 02 February 2001 (02.02.01)	Date of completion of this report 11 October 2001 (11.10.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages _____ 1-20 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages _____ 1-19 _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
pages _____ 1/1 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the sequence listing part of the description:
pages _____ 1-11 _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 00/02262

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: I

The claimed priority appears to be valid.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

DE 00/02262

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	8 - 18	YES
	Claims	1 - 7, 19	NO
Inventive step (IS)	Claims	9, 10, 13, 15 - 17	YES
	Claims	1 - 8, 11, 12, 14, 18, 19	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 19	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. The present application relates to a DNA vaccine for the protective vaccination of cats against the feline immunodeficiency virus.

2. The present report is based on the following documents:

D1: FR-A-2 751 223

D2: WO-A-94/06471

D3: WO-A-95/30019

D4: US-A-5 571 515

D5: Journal of Virology (Sept. 1998), Vol. 72, No. 9, pp. 7310 - 7319

D6: DNA SEQUENCE, (1997), Vol. 8, No. 1 - 2, pp. 77 - 82

D7: VACCINE (Feb. 1999), Vol. 17, No. 5, pp. 415 - 425

3. The subjects of Claims 1 - 7 and 19 do not appear to be novel within the meaning of **PCT Article 33(2)**, having regard to documents D1 - D3 or D5.

3.1 D1 discloses a combined DNA vaccine which contains a plasmid that codes for the env and gag/pro proteins

.../...

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(Continuation of V.2)

(page 2, lines 17 - 32). The plasmid also contains a promoter which facilitates expression in the host cell (page 4, lines 7 - 9). D1 therefore discloses a vaccine for the protective vaccination of a lentiviral infection (in particular FIV) in Felidae (in particular cats) which contains at least part of the env gene and a promoter capable of operating in the animal.

This objection could also be based on D2, D3 or D5. All those documents disclose DNA vaccines for protective vaccination against the feline immunodeficiency virus which contain at least parts of the gene coding for the env protein.

3.2 D2 additionally discloses the recombinant production of the env protein for use as a vaccine (e.g., page 15, penultimate paragraph to page 17, second paragraph). The subject matter of Claim 19 is therefore not novel (**PCT Article 33(2)**).

4. The subjects of Claims 8, 11, 12, 14 and 18 do not involve an inventive step within the meaning of **PCT Article 33(3)**.

4.1 D4 discloses, as mentioned in the application, the use of IL-12 as an adjuvant in humans.

It can also be inferred from D6 that it was known to a person skilled in the art that the use of IL-12 elicits the Th1 immune response (abstract). It was further known to a person skilled in the art that a stimulation Th1 immune response is at least desirable

.../...

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(Continuation of V.2)

for combating the FIV-virus (D7, page 416, lines 2 - 5). It therefore seems that it was obvious to a person skilled in the art to use IL-12 as an adjuvant in cats. It should also be noted that it is already proposed in D6 that appropriate tests be carried out.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The references to the SEQ ID numbers in Claim 7 are not correct. SEQ ID NO 4 does not appear to be the coding sequence of the plasmid sequence cited as SEQ ID NO 1.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

P/ ENT COOPERATION TREA

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 27 March 2001 (27.03.01)	
International application No. PCT/DE00/02262	Applicant's or agent's file reference XI 1057/00
International filing date (day/month/year) 08 July 2000 (08.07.00)	Priority date (day/month/year) 08 July 1999 (08.07.99)
Applicant LEUTENEGGER, Christian et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:02 February 2001 (02.02.01)☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Antonia Muller Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10/030500 16T

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 15 OCT 2001

WIPO PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts XI 1057/00	WEITERES VORGEHEN <small>siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)</small>	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/02262	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 08/07/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 08/07/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/00		
Anmelder MOLOGEN FORSCHUNGS-, ENTWICKLUNGS- UND ... et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 02/02/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 11.10.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde: <div style="display: flex; align-items: center;"> <div> Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465 </div> </div>	Bevollmächtigter Bediensteter Bilang, J Tel. Nr. +49 89 2399 8707



THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Grundlag des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-20 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-19 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/1 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

1-11, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	8-18
	Nein: Ansprüche	1-7, 19
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	9, 10, 13, 15-17
	Nein: Ansprüche	1-8, 11, 12, 14, 18, 19
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-19
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt**

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Bemerkungen zu Punkt I

Die beanspruchte Priorität scheint gültig zu sein.

Bemerkungen zu Punkt V

1. Die vorliegende Anmeldung betrifft eine DNA-Vakzine zur Schutzimpfung von Katzen gegen das Feline Immunschwäche-Virus.

2. Der vorliegende Bericht stützt sich auf die folgenden Dokumente:

D1: FR-A-2751223

D2: WO-A-9406471

D3: WO-A-9530019

D4: US-A-5571515

D5: Journal Of Virology (Sept. 1998), Bd. 72, No. 9, S. 7310-7319

D6: DNA SEQUENCE, (1997), Bd. 8, No. 1-2, S. 77-82.

D7: VACCINE (Feb. 1999), Bd. 17, No. 5, S. 415-425

3. Mit Hinblick auf die Dokumente D1-D3 oder D5 scheint der Gegenstand der Ansprüche 1-7 und 19 nicht neu im Sinne von **Artikel 33(2) PCT** zu sein.

- 3.1 D1 offenbart eine kombinierte DNA Vakzine, welche ein für das env- und gag/pro-Protein kodierendes Plasmid enthält (S. 2, Z. 17-32). Das Plasmid enthält ebenfalls einen Promoter, welcher in die Expression in der Wirtszelle ermöglicht (S. 4, Z. 7-9). Somit offenbart D1 eine Vakzine zur Schutzimpfung einer Lentiviren-Infektion (insbesondere FIV) bei Feliden (insbesondere Katzen), welche mindestens einen Teil des env-Genes und einen im Tier operablen Promoter enthält.

Dieser Einwand könnte auch auf D2, D3, oder D5 gestützt werden. Diese Dokumente offenbaren alle DNA Vakzinen zur Schutzimpfung gegen das Feline Immunschwäche-Virus, welche mindestens Teile des für das env-Protein kodierende Gen enthalten.

- 3.2 D2 offenbart ausserdem die rekombinante Herstellung des env Proteins zur

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Verwendung als Vakzine (e.g. S. 15, Zweitletzter Abschnitt - S. 17, 2. Abschnitt).
Der Gegenstand des Anspruchs 19 ist daher nicht neu (**Artikel 33(2) PCT**).

4. Der Gegenstand der Ansprüche 8, 11, 12, 14, und 18 beruht nicht auf einer erfinderischen Tätigkeit im Sinne von **Artikel 33(3) PCT**.
- 4.1 D4 offenbart, wie in der Anmeldung erwähnt, die Verwendung von IL-12 als Adjuvans beim Menschen.

Aus D6 ist ableitbar, dass dem Fachmann bewusst war, dass die Verwendung von IL-12 zur Induktion der Th1-Immunantwort führt (Zusammenfassung). Dem Fachmann war des weiteren bewusst, dass eine Stimulation Th1-Immunantwort zur Bekämpfung des FIV-Virus zumindest wünschenswert ist (D7, S. 416, Z. 2-5). Es scheint also, dass es für den Fachmann naheliegend war, IL-12 in Katzen als Adjuvans zu verwenden. Es wird auch darauf hingewiesen, dass bereits in D6 vorgeschlagen wird, entsprechende Versuche zu unternehmen.

Bemerkungen zu Punkt VIII

Die Verweise auf die SEQ ID Nummern in Anspruch 7 ist nicht korrekt. SEQ ID NO 4 scheint nicht die kodierende Sequenz der unter SEQ ID NO 1 angegebenen Plasmidsequenz zu sein.

THIS PAGE BLANK (USPTO)